ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 16
1967

INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES
BIBLIOTHÈQUE DE
30 OCT. 1968
VERSAILLES

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 16 1967 NUMÉRO 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique, à l'exception des sommaires et résumés.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (1), 5-25.

MÉTHODE DE DÉTERMINATION RAPIDE DES ISOTHERMES DE SORPTION DE VAPEUR D'EAU

J.-L. MULTON et A. GUILBOT
avec la collaboration technique de E. POPULUS

Station de Biochimie et Physico-chimie des Céréales et de leurs Dérivés
C.E.R.D.I.A., le Noyer-Lambert, 91 - Massy

SOMMAIRE

La méthode proposée permet d'établir les isothermes de sorption de vapeur d'eau de substance variées. Tout en ayant une précision et une reproductibilité analogues aux meilleures technique déjà décrites, elle offre en plus deux avantages importants : sa rapidité et son application simultanée à un grand nombre d'échantillons. L'appareillage mis au point peut également servir à l'étalonnage et au contrôle des hygromètres électriques à petites sondes, destinées aux espaces confinés.

I. — INTRODUCTION

Les isothermes de sorption de vapeur d'eau des substances biologiques traduisant la relation entre la teneur en eau des produits et l'humidité relative (1) de l'atmosphère en équilibre avec ces produits à une température *t*, présentent à l'heure actuelle une importance de plus en plus grande.

Sur le plan théorique, leur étude conduit à une meilleure connaissance de la structure de la matière, en précisant par exemple le mode de liaison de l'eau sur les macromolécules de l'amidon (GUILBOT, CHARBONNIÈRE et DRAPRON, 1961). A partir du réseau de ces isothermes, il est possible de construire les isostères d'adsorption pour le calcul des chaleurs de sorption, sans avoir recours à des méthodes calorimétriques. Par ailleurs, la connaissance de l'humidité relative en fonction de la teneur en eau des produits s'avère être une notion essentielle dans l'évolution de nombreux processus biologiques. Il en est de même de l'activité des différents microorganismes, moisissures, levures, bactéries (SCOTT, 1957 ; POISSON et GUILBOT, 1963) ou de celle des enzymes (ACKER, 1963 ; DRAPRON et GUILBOT, 1962 ; GUILBOT et DRAPRON, 1965). Il existe en effet un seuil d'H. R. en dessous duquel chacune de ces activités

(1) Rappelons que l'humidité relative (que nous noterons dans la suite : H. R.) est le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau à la pression de vapeur saturante à la même température. Dans les calculs, nous poserons H. R. = φ).

est bloquée, la quantité d'eau solvante disponible pour que les réactions s'effectuent étant insuffisante (GUILBOT et LINDENBERG, 1960). De même, certaines réactions chimiques très importantes sont conditionnées par la teneur en eau de la substance : les réactions de Maillard présentent un optimum entre 50 et 80 p. 100 d'H. R. (LEA et HANNAN, 1949 ; LONCIN et coll., 1965) et les oxydations sont favorisées à très basse H. R. La dénaturation des protéines est également fonction de la teneur en eau de la substance, bien que cette action soit assez mal connue (KUPRIANOFF, 1965).

Sur le plan pratique et technologique, l'étude des isothermes de sorption permet une meilleure conservation des denrées alimentaires en cours de stockage et une conduite rationnelle du séchage lorsque ces matières sont trop humides.

A ces besoins importants répondent de nombreuses méthodes de mesure des équilibres de sorption ; elles peuvent se répartir en trois groupes principaux :

a) Avec les méthodes « gravimétriques », l'échantillon est placé dans une atmosphère gazeuse, calme ou turbulente, dont l'H. R. est régulée par des systèmes très variés, dont une étude critique détaillée sera faite ultérieurement. Lorsque l'équilibre est atteint, la masse de la substance demeure constante, et il suffit de doser l'eau fixée par le produit (DRAPRON et GUILBOT, 1962 ; POERSCH, 1963 ; LONCIN et coll., 1965). Des dispositifs ont été décrits pour suivre les variations de masse de l'échantillon directement dans l'enceinte, en le suspendant au plateau d'une balance ou à l'extrémité d'un ressort taré, en quartz (MCBAIN, 1930).

b) Les méthodes manométriques permettent la mesure directe de la pression partielle de vapeur d'eau en équilibre avec une substance dont la teneur en eau est connue (COPPENS et WEI, 1954 ; PICHLER, 1956 ; TAYLOR, 1961 ; KNEULE, 1964).

c) Enfin dans le domaine des très hautes humidités relatives, peu accessibles par les méthodes *a* et *b*, une technique spéciale permet de mesurer la pression de succion capillaire de l'eau adsorbée (MACEY, 1942 ; GOERLING, 1954 ; GUR-ARIEH et coll., 1965), en dosant la teneur en eau résiduelle d'une substance soumise à une pression plus ou moins importante.

Les méthodes décrites jusqu'à présent permettent d'établir seulement une courbe de sorption à la fois, et, pour ce faire, exigent généralement un temps assez long (de 2 à 15 jours). Le procédé présenté, adopté après une étude critique des autres techniques, fait partie des méthodes gravimétriques ; il consiste à laisser la substance se mettre en équilibre de teneur en eau avec un courant gazeux d'H. R. connue. Le conditionnement est réalisé selon un principe physique qui a été appliqué par WEAVER et RILEY (1948) à la construction d'un hygromètre et que GAC et LAINÉ (1951), AMDUR et WHITE (1965), ainsi que MULTON (1966) ont retenu pour élaborer des enceintes à H. R. régulée.

II. — MÉTHODE ET APPAREILLAGE UTILISÉS

A — *Principe*

La régulation de l'H. R. consiste à amener, dans un saturateur, la pression partielle de vapeur d'eau d'un mélange gazeux sous pression à être saturante, puis à détendre le mélange isothermiquement par laminage jusqu'à la pression atmosphérique.

Le mélange gazeux est en général de l'air, mais n'importe quel gaz ne créant pas d'association moléculaire avec l'eau convient également (l'azote par exemple).

— *Dans le saturateur*, la pression totale est $H + \pi$ (H étant la pression atmosphérique, π la surpression lue sur le manomètre). La pression partielle de vapeur d'eau p est saturante à la température du saturateur, soit p_s.

— *Dans l'enceinte*, après détente, la pression totale devient égale à H ; la pression partielle de chaque composant (de la vapeur d'eau en particulier) est réduite dans le même rapport, et p devient alors $p = p_s \cdot \frac{H}{H + \pi}$. Si la température est la même que dans le saturateur, l'humidité relative H. R. est ainsi donnée par :

$$\text{H. R.} = \frac{p}{p_s} = \frac{H}{H + \pi}.$$

Rapportée à 100 on a $\text{H. R.} = \frac{H}{H + \pi} \times 100$.

En supposant la pression atmosphérique constante, l'H. R. ne dépend donc que de la pression de saturation π.

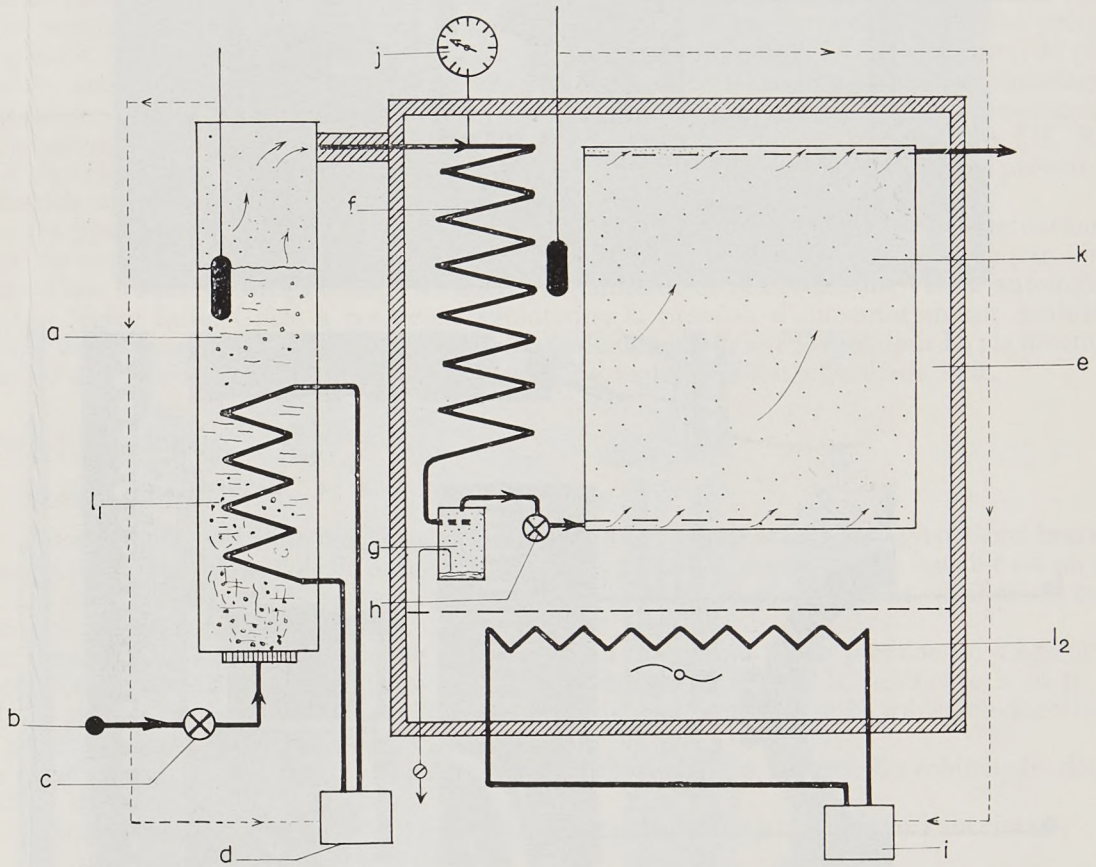


FIG. 1. — *Schéma représentant le principe de la régulation de l'humidité relative*

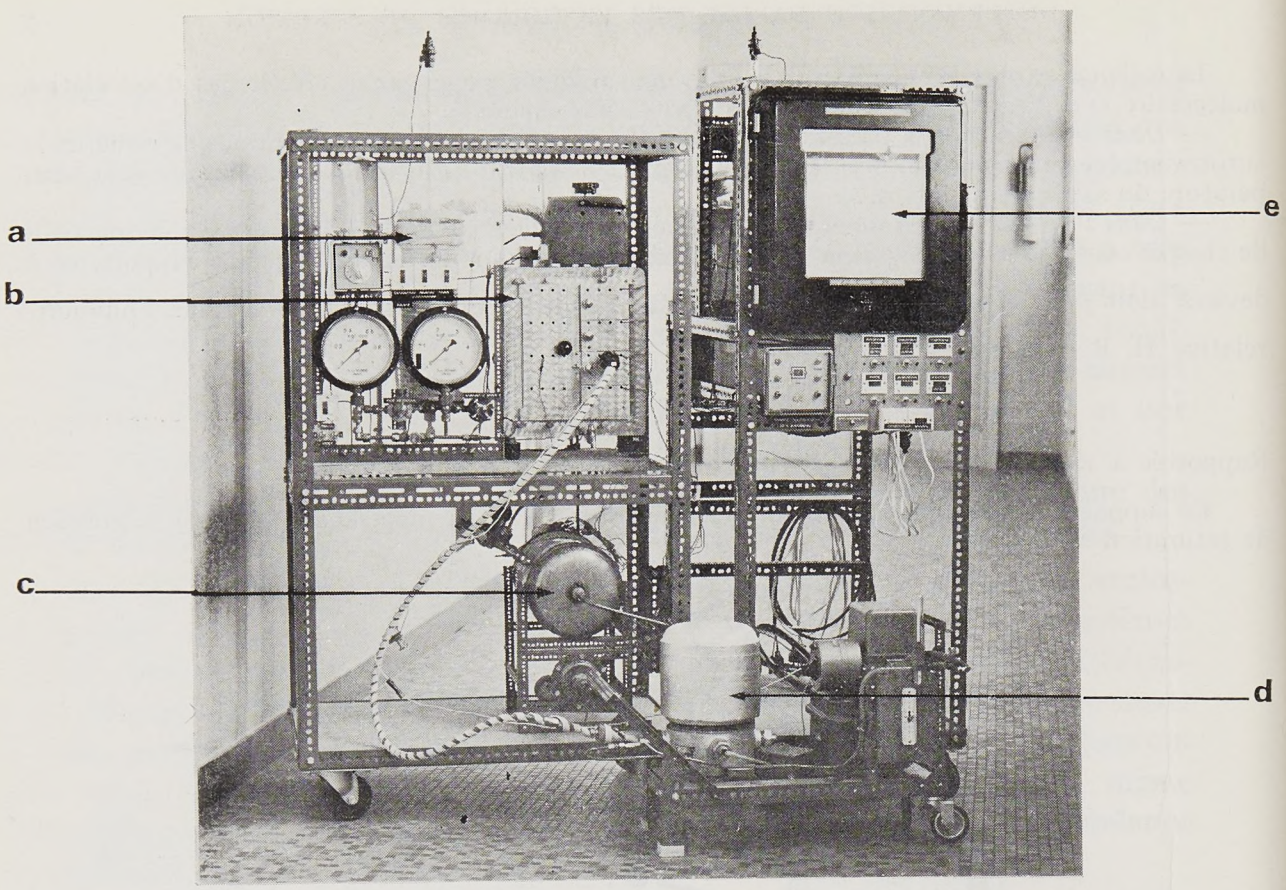
a) saturateur ; *b*) arrivée d'air comprimé ; *c*) détendeur D_1 *d*) régulation de température du saturateur ; *e*) enceinte conditionnée en température ; *f*) échangeur de température ; *g*) fiole de récupération ; *h*) détendeur D_2 ; *i*) régulation de température de l'enceinte ; *j*) manomètre ; *k*) cellule à humidité relative constante ; l_1 et l_2) échangeur thermique (cet élément est constitué soit d'une résistance chauffante, soit d'un tuyau de circulation de saumure, soit encore d'un évaporateur frigorifique)

B — *Réalisation*

Nous avons réalisé le montage suivant (fig. 2) qui met en œuvre le principe décrit ci-dessus.

1. *Étuve conditionnée.*

— Le saturateur (fig. 2, A, *a*) est constitué par un cylindre en acier inoxydable (hauteur : 40 cm, diamètre : 10 cm) garni aux trois quarts d'anneaux de Raschi destinés à améliorer les surfaces



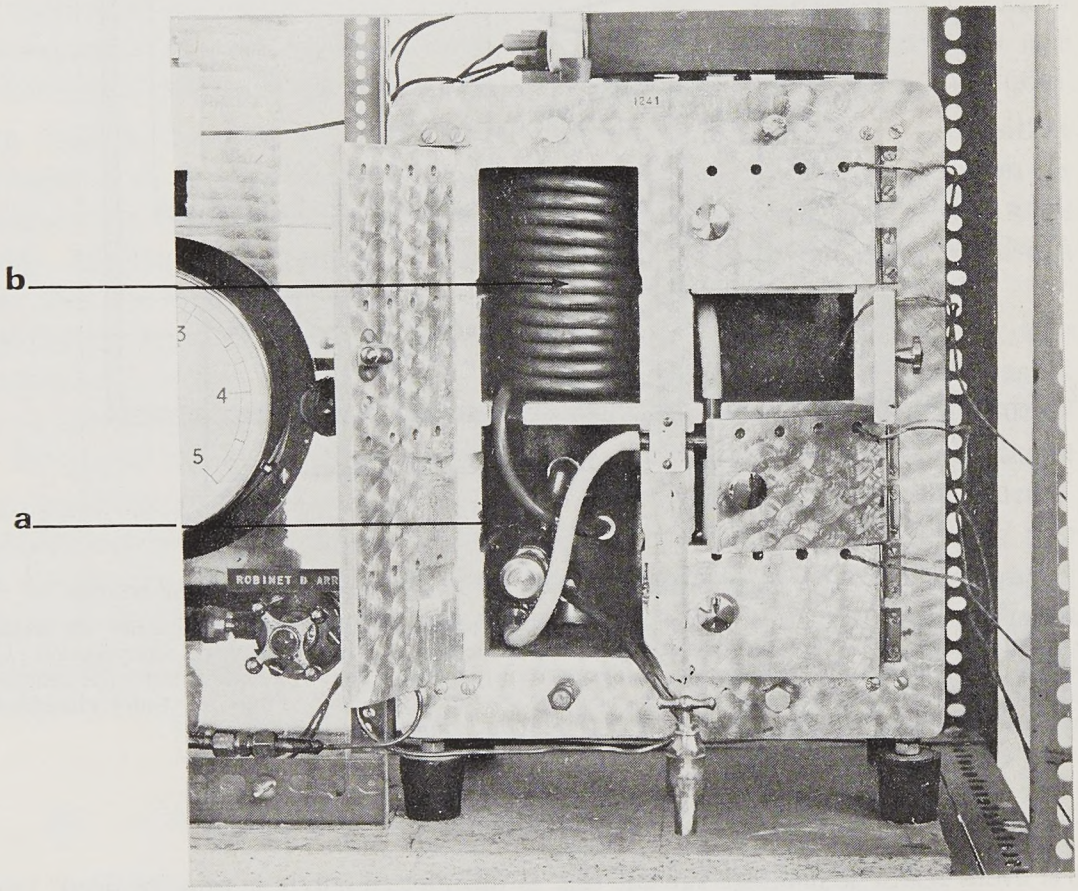


FIG. 2. A — *Vue d'ensemble de l'appareillage de conditionnement d'air*
a) saturateur ; *b*) enceinte conditionnée ; *c*) réservoir tampon d'air comprimé ; *d*) hygromètre ; *e*) potentiomètre enregistreur

B — *Vue de l'enceinte conditionnée*
a) fiole de récupération F et détendeur D_1 ; *b*) échangeur de température

d'échange entre les phases liquide et vapeur. L'air pénètre à la base de l'appareil à travers une plaque d'acier inoxydable fritté qui le divise en bulles très fines. Les débits peuvent varier de 0,200 à 1 m^3/h (débit ramené à la pression atmosphérique).

Le chauffage de ce saturateur est assuré par un ruban chauffant (puissance de 180 watts) enroulé extérieurement et commandé par un thermostat (thermomètre à contact) associé à un relais et à un simmerstat.

— L'enceinte conditionnée est constituée par une étuve multicellulaire [1] (fig. 2, A, *b* et fig. 2 B) dont la partie gauche comporte l'échangeur de température (fig. 2 B, *b*), composé de deux serpentins en tube de cuivre de diamètre 6-8 mm, d'une longueur de 2 m environ, une fiole de récupération et un détendeur D_2 (fig. 2 B, *a*) ; la partie droite a conservé ses quatre cellules où sont disposés les échantillons.

Chaque cellule comporte une porte indépendante afin que la manipulation d'un échantillon dans l'une d'entre elles ne perturbe pas l'atmosphère des trois autres.

Chaque alvéole mesure environ 6 × 9 × 18 cm, ce qui représente un volume utile total de quatre fois 972 cm^3, soit 3,88 litres.

Le tuyau de liaison entre le saturateur et l'étuve est isolé pour éviter toute condensation et éventuellement il peut être chauffé. L'étuve et le saturateur ne peuvent être que chauffés. Il serait possible de prévoir une circulation de saumure froide autour de l'étuve et dans le saturateur ; néanmoins ce montage étant assez complexe et coûteux, et risquant en outre de donner une précision moins grande, il nous a paru préférable pour les températures inférieures à celle ambiante, de placer l'ensemble dans une chambre froide et de régler à la température convenable par chauffage.

La gamme des températures utilisables va ainsi de 0 à 100°C. Au-delà de 60°C, la consommation d'eau du saturateur devient considérable ; elle est facilement calculable, connaissant l'H. R., le débit et la température, sur le diagramme de l'air humide ; il serait intéressant de prévoir une alimentation automatique du saturateur.

— Un poste central de compression fournit l'air comprimé. Pour amortir les fluctuations de pression du compresseur, l'air pénètre d'abord dans un réservoir-tampon (fig. 2, A, *c*) par l'intermédiaire d'une vanne autorégulatrice ; à l'autre extrémité de ce réservoir, une vanne automatique assure une légère fuite. Grâce à ces deux régulateurs, la pression d'alimentation est maintenue constante. La pression de saturation est réglée à l'aide du détendeur auto-régulateur D_1 ; la détente D_2 s'opère à l'aide d'un robinet-pointeau qui permet de régler le débit effectif de l'air.

2. *Appareils de mesures.*

a) *Destinés au réglage.*

— Deux manomètres étalonnés respectivement de 0 à 1 kg/cm^2 et de 0 à 5 kg/cm^2 sont branchés sur la sortie de vidange de la fiole de condensation F. Ces appareils, dont l'organe sensible est un tube cintré, ont une précision de ± 0,75 p. 100 sur toute l'échelle. De plus, ils sont vérifiés de temps à autre avec un manomètre à mercure.

Les appareils utilisés permettent de fonctionner au maximum à une pression de 5 kg/cm^2, ce qui correspond à une H. R. minimale de 20 p. 100. Pour obtenir une H. R. inférieure à 20 p. 100, il faudrait prévoir un matériel (vannes, joints, raccords, compresseur) susceptibles de fonctionner à une pression supérieure à 5 kg/cm^2.

Le débit de l'air après détente peut être vérifié en branchant à la sortie du robinet de détente un ajutage de Venturi.

— Deux thermomètres placés respectivement dans le saturateur et dans l'enceinte.

b) *Destinés au contrôle.*

— L'appareil de mesure de l'humidité relative, choisi après avoir examiné les principaux matériels existants, est un hygromètre électronique (fig. 2, A, *d*) à mesure automatique du point de rosée par refroidissement thermo-électrique [2]. Les éléments de mesure sont enfermés dans une cloche à température régulée : ceci permet la mesure des températures de rosée supérieures à l'ambiante. Le constructeur garantit une fidélité de ± 0,2°C et une précision meilleure que ± 1°C sur la température de rosée.

A l'aide d'une petite pompe et d'un tuyau non hygroscopique en teflon, un échantillon de l'air est prélevé en continu dans l'étuve avec un débit très faible (0,5 l/mn) et passe sur le miroir de l'appareil.

[1] L'Étuve Chopin multicellulaire convient parfaitement pour ce montage, après quelques aménagements de détails. En particulier la régulation de température propre à cette étuve et qui donne d'excellents résultats, a été conservée : seul un transformateur variable a été introduit dans le circuit d'alimentation pour diminuer la puissance de chauffe à basse température.

[2] Compagnie des Compteurs (Aqmel) Type $HCPI/E_1$ AD 50.

— Un potentiomètre enregistreur à 12 voies d'enregistrement, 5 sensibilités et décalage d'origine est accouplé à l'hygromètre. Les éléments sensibles de mesure de température sont des thermocouples cuivre-constantan, type T normalisé, dont le choix a été imposé par l'équipement livré avec l'hygromètre ; avec un réglage sur la plus grande sensibilité (1 mV sur toute l'échelle) ils permettent d'apprécier ± 0,1°C.

L'ensemble ainsi formé est, sur le marché mondial, l'un des meilleurs actuellement disponibles pour la mesure de l'H. R., dans des enceintes de toutes dimensions ; cependant son encombrement est important et son maniement reste assez délicat.

La répartition des voies d'enregistrement est la suivante : les six premières voies sont branchées en parallèle sur le thermocouple noyé dans le miroir de l'hygromètre pour obtenir un enregistrement quasi continu. Aux cinq voies suivantes, correspondent 5 thermocouples disposés dans l'étuve Chopin : 4 dans chacune des alvéoles et un contre l'échangeur de chaleur ; la dernière voie correspond à un thermocouple placé dans un bain à température constante, servant à contrôler la bonne marche du potentiomètre. Il n'y a qu'une seule soudure froide, plongée dans un mélange eau-glace en équilibre, et sur laquelle les 12 circuits thermosensibles sont montés en parallèle.

A partir des enregistrements des mesures :

a) de la température de rosée de l'air ;

b) des températures sèches dans les 4 alvéoles de l'étuve, on calcule facilement l'humidité relative de l'air grâce aux tables de pressions de vapeur saturante, de l'eau. Notons que l'hygromètre fonctionne au maximum pour une température sèche de 70°C.

Cet appareillage de contrôle n'est pas indispensable ; lorsqu'il n'est pas utilisé, l'H. R. est connue avec une certaine erreur qui est calculée au cours de l'étude critique de la méthode.

III. — ÉTUDE CRITIQUE DE LA MÉTHODE

A. — Sur le plan théorique

Différents facteurs — variations de pression, variations de température — peuvent intervenir pour fausser la valeur de l'humidité relative ; une analyse théorique en est présentée, avant de montrer ce que l'on observe expérimentalement.

1. *Influence des variations de pression*

On a vu que

$$\varphi = \frac{H}{H + \pi} \tag{1}$$

π étant la pression de saturation (lue sur le manomètre)

et H étant la pression atmosphérique.

Nous avons affaire à deux variables non indépendantes au numérateur et au dénominateur. L'erreur relative vraie sur φ est égale à la différentielle logarithmique :

$$\frac{d\varphi}{\varphi} = \frac{dH}{H} - \frac{d(H + \pi)}{H + \pi}$$

$$\frac{d\varphi}{\varphi} = \frac{dH}{H} - \frac{dH}{H + \pi} - \frac{d\pi}{H + \pi} = dH\left(\frac{1}{H} - \frac{1}{H + \pi}\right) - \frac{d\pi}{H + \pi}$$

$$= dH\,\frac{\pi}{H(H + \pi)} - \frac{d\pi}{H + \pi}$$

$$\frac{d\varphi}{\varphi} = \frac{\pi\, dH - H\, d\pi}{H\,(H + \pi)}$$

En remplaçant les erreurs vraies $d\varphi$, dH, $d\pi$ par les erreurs maximales possibles $\Delta\varphi$ ΔH, $\Delta\pi$, on obtient :

$$\frac{\Delta\varphi}{\varphi} = \frac{\pi\,\Delta H + H\,\Delta\pi}{H\,(H + \pi)}$$

On peut donc décomposer l'erreur relative en deux termes :

— en considérant H comme constante

$$\left(\frac{\Delta\varphi}{\varphi}\right)_{H\,=\,cte} = \frac{\Delta\pi}{H + \pi} \tag{2}$$

— en considérant π comme une constante

$$\left(\frac{\Delta\varphi}{\varphi}\right)_{\pi\,=\,cte} = \frac{\pi}{H\,(H + \pi)}\,\Delta H \tag{3}$$

Ces erreurs relatives peuvent s'exprimer directement en fonction de φ ; on aboutit à :

$$\left(\frac{\Delta\varphi}{\varphi}\right)_{H\,=\,cte} = \frac{\varphi}{H}\,\Delta\pi \tag{4}$$

$$\left(\frac{\Delta\varphi}{\varphi}\right)_{\pi\,=\,cte} = \frac{\pi}{H^2}\,\varphi\,\Delta H \tag{5}$$

$$\left(\frac{\Delta\varphi}{\varphi}\right)_{\pi\,=\,cte} = (1 - \varphi)\,\frac{\Delta H}{H} \tag{6}$$

en éliminant respectivement $H + \pi$ entre (1) et (2), (1) et (3) et π entre (1) et (5). Les erreurs relatives en fonction de φ sont donc :

$$\boxed{\left(\frac{\Delta\varphi}{\varphi}\right)_{H\,=\,cte} = \frac{\varphi}{H}\,\Delta\pi} \tag{7}$$

$$\boxed{\left(\frac{\Delta\varphi}{\varphi}\right)_{\pi\,=\,cte} = (1 - \varphi)\,\frac{\Delta H}{H}} \tag{8}$$

Les variations de pression $\Delta\pi$ lues sur le manomètre sont de l'ordre de $\pm$ 0,005 kg/cm² ; par sécurité, nous admettrons $\pm$ 0,010 kg/cm².

Les variations de pression atmosphérique sont en général de l'ordre de $\pm$ 1 cm de Hg ; nous admettrons $\pm$ 2 cm de Hg au maximum. Dans ces conditions :

$$\left(\frac{\Delta\varphi}{\varphi}\right)_{H\,=\,cte} = \frac{0{,}01}{1}\,\varphi \quad \text{et} \quad \left(\frac{\Delta\varphi}{\varphi}\right)_{\pi\,=\,cte} = \frac{2}{76}\,(1 - \varphi)$$

Ces deux erreurs relatives s'ajoutent et la figure 3 montre que leur variation en fonction de l'H. R. est inverse.

dans les conditions géométriques de l'appareil, le débit dans le saturateur doit être au minimum de 200 l/h, faute de quoi les turbulences n'étant pas assez importantes, la saturation de l'air est défectueuse ; l'H. R. est instable et reste inférieure à sa valeur normale.

De 200 l/h à 1 000 l/h, débit maximum possible avec l'appareil, l'H. R. est stable et sa valeur est juste.

Ces débits, importants relativement au volume de l'enceinte à conditionner, permettent un changement très rapide de l'H. R., par variation de la pression π, lorsqu'on ne modifie pas les températures du saturateur et de l'enceinte (fig. 5).

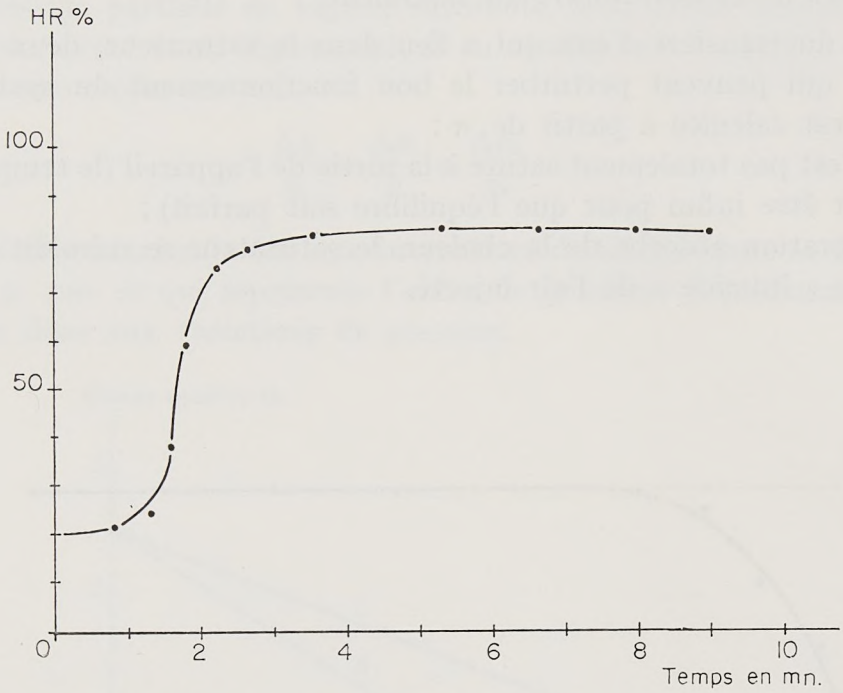


FIG. 5. — *Temps nécessaire à un changement d'H. R. dans l'étuve, par variation de* π

b) *Influence de l'hétérogénéité de la géographie thermique de l'enceinte conditionnée.*

Lorsque l'étuve multicellulaire a atteint son régime d'équilibre thermique (4 à 5 h après sa mise sous tension ou après un changement de température), elle possède une régulation thermique d'une précision rarement atteinte ; il y a cependant une certaine hétérogénéité, inévitable, de la température en différents points (GUILBOT, 1964). Les relevés de température réalisés à l'aide de thermocouples en différents points de l'étuve utilisée comme enceinte conditionnée, ont donné les résultats suivants :

— *Dans une même alvéole*, la température est identique en tous points, contrairement à ce qui a été observé dans l'étuve Chopin non modifiée. On note cependant une variation périodique, faible, de l'ordre de $\pm$ 0,1°C, due aux cycles de chauffage. Il y a intérêt, de ce point de vue, à ce que l'appareil soit placé dans une pièce dont la température soit proche de celle de l'étuve en lui restant inférieure, et varie peu.

— D'une alvéole à l'autre, il existe, par contre, des différences : les températures des deux alvéoles centrales sont pratiquement identiques ; celles des alvéoles supérieure et inférieure sont légèrement plus faibles, l'écart maximal pouvant atteindre 1°C. De plus, lorsque l'H. R. devient telle que la température de rosée soit supérieure à la température sèche du local où se trouve l'appareil, le tuyau de

prélèvement d'air de l'hygromètre doit être chauffé pour éviter toute condensation. L'alvéole sur laquelle est effectué le prélèvement est, dans ce cas, légèrement chauffée par conduction et se trouve être alors la plus chaude. L'écart de température ne dépasse cependant jamais l'extremum cité (tabl. 1) si l'on prend soin de porter le tuyau à une température à peine supérieure à la température de rosée.

Compte tenu des observations précédentes, les variations de la température de rosée indiquées par l'hygromètre étant inférieures à 1,0°C, il en résulte que l'H. R. d'une alvéole donnée est constante, dans les limites données par le calcul d'erreur. Par contre, d'une alvéole à l'autre, il existe de petites différences qui ne dépassent pas 1 à 1,5 p. 100 en valeur absolue par rapport à l'humidité relative moyenne résultante. Par conséquent, dans la majorité des cas, il ne sera pas tenu compte de ces différences, et seule l'H. R. moyenne sera prise en considération. Dans une expérience requérant une grande précision, il pourra néanmoins en être tenu compte, soit en calculant l'H. R. correspondant à chaque alvéole, soit en n'utilisant qu'une seule alvéole.

TABLEAU 1

Comparaison des températures sèches (t_s) et des humidités relatives mesurées dans les différentes alvéoles de l'enceinte conditionnée, d'une part dans le cas d'une température de rosée (t_r) inférieure à la température du local (26°C) et d'autre part, dans le cas contraire qui entraîne le réchauffage du tuyau de prélèvement.

Alvéoles numérotées de haut en bas	Tuyau de prélèvement non chauffé			Tuyau chauffé et placé sur alvéole 4		
	t_r (°C)	t_s (°C)	H. R. (%)	t_r (°C)	t_s (°C)	H. R. (%)
1	17,8	29,4	49,6	28,2	29,6	92,1
2	17,8	29,6	49,2	28,2	29,8	91,0
3	17,8	29,6	49,2	28,2	29,8	91,0
4	17,8	29,2	50,3	28,2	30,0	90,1

c) *Comparaison de la valeur théorique de l'H. R. avec celle donnée par l'hygromètre.*

Au cours de plusieurs expériences indépendantes réalisées à 30°C, l'H. R. réelle régnant dans les alvéoles et mesurée avec l'hygromètre, a été comparée aux valeurs théoriques correspondant à la pression de saturation, calculées selon la formule (1) : H. R. $= \frac{H}{H + \pi}$; la pression atmosphérique a été considérée égale à 1 kg/cm² ; quant à la pression différentielle π, elle a été lue sur les manomètres.

Les valeurs trouvées ont été soumises au calcul statistique relatif aux petits échantillons, calcul qui permet d'évaluer la précision de la moyenne selon la méthode classique de Fisher. Les résultats sont présentés dans le tableau 2 où sont indiqués le nombre n d'expériences, la moyenne m, la variance calculée selon la formule classique $\sigma^2 = \frac{\Sigma(x_i - m)^2}{n - 1}$, l'intervalle de confiance de la moyenne $\pm t \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ (t, étant lu

dans la table de Fisher pour le degré de liberté $n - 1$, et au risque 5 p. 100), enfin l'incertitude relative qui affecte la moyenne.

La courbe théorique calculée avec la formule (1) représentant la variation d'H. R. en fonction de la pression est présentée sur la figure 6 ; sur cette même figure, les points expérimentaux ont été représentés par un petit segment de droite, dont la longueur est égale à l'intervalle de confiance.

Il apparait que les H. R. moyennes obtenues se situent légèrement en dessous des valeurs théoriques. L'intervalle de confiance de la moyenne est du même ordre de grandeur que l'erreur absolue prévue par le calcul d'erreur. La variation de l'incertitude relative de la moyenne en fonction de l'H. R. est linéaire et décroissante comme le montre la droite de régression établie à partir des données expérimentales.

Le coefficient de régression calculé selon la formule :

$$r = \frac{\Sigma\,(x - m_x) \cdot (y - m_y)}{\sqrt{\Sigma\,(x - m_x)^2 \cdot \Sigma\,(y - m_y)^2}}$$

où y est l'incertitude relative, x l'H. R., m_y et m_x, les moyennes correspondantes, montre une corrélation très significative ($r = -0{,}84$, soit, avec un degré de liberté égal à 7, une probabilité supérieure à 99 p. 100).

TABLEAU 2

Analyse statistique des humidités relatives mesurées à l'hygromètre et comparaison avec les valeurs calculées

Humidité relative théorique p. 100	20	30	40	50	60	70	80	90	95
Nombre d'expériences	8	8	8	9	13	11	11	10	3
Variance	0,32	0,58	0,45	1,12	1,29	2,73	2,76	1,41	0,19
t au risque 5 %	2,36	2,36	2,36	2,20	2,17	2,22	2,22	2,26	4,30
H. R. moyenne mesurée % .	20,34	29,73	39,50	50,09	59,89	69,85	79,49	88,90	94,70
Intervalle de confiance	± 0,47	± 0,63	± 0,56	± 0,80	± 0,65	± 1,08	± 1,10	± 0,85	± 1,07
Incertitude relative %	2,32	2,12	1,41	1,60	1,08	1,55	1,38	0,95	1,14

Ce résultat est très voisin de celui donné par le calcul théorique d'erreur (fig. 3) ; l'incertitude relative expérimentale, en particulier aux hautes H. R., est même légèrement inférieure à celle calculée, ce qui laisse à penser que les fluctuations de pression sont moins importantes que celles retenues pour les calculs dont le but était de fournir une évaluation maximale de l'erreur.

Ces résultats montrent que l'appareil fonctionne de façon satisfaisante ; ils appellent cependant deux remarques importantes :

— les erreurs observées sont du même ordre de grandeur que celles encourues dans les mesures hygrométriques. Le constructeur de l'hygromètre garantit une reproductibilité de l'ordre de ± 0,2°C sur la mesure de la température de rosée ; l'appréciation de la température sèche étant également, à ± 0,2°C près, l'erreur

résultante sur le calcul de l'H. R. est de l'ordre de 1 p. 100 en valeur absolue. Dans ces conditions, on ne saurait dire si les fluctuations consignées dans le tableau 2 sont le fait de l'hygromètre ou de l'appareil de conditionnement.

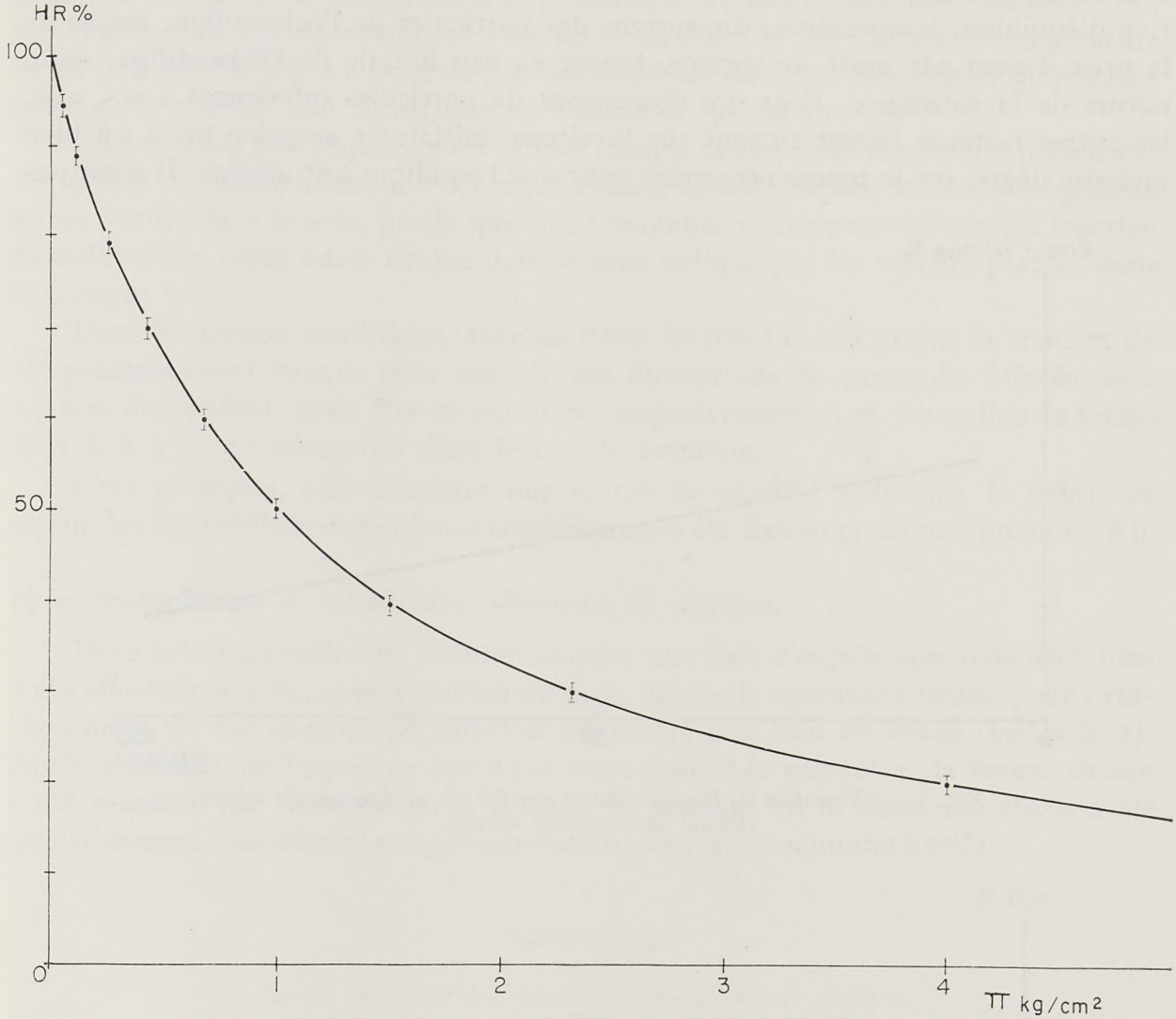


FIG. 6. — *Évolution de l'humidité relative de l'enceinte conditionnée en fonction de la pression de saturation π de l'air*

(Courbe théorique correspondant à la formule H. R. $= \frac{H}{H + \pi}$ et points expérimentaux.)

— la précision du réglage de l'H. R. dépend de la précision de lecture du manomètre. Des manomètres de type métallique arrivent à la longue à se dérégler et il est alors nécessaire de les étalonner à nouveau. Si l'on désire une plus grande sûreté dans la mesure de la pression (dans le cas par exemple où l'on ne disposerait pas du contrôle d'un hygromètre) il est indispensable d'utiliser un manomètre à mercure ou de vérifier souvent le manomètre s'il est d'un autre type.

2. *Examen critique et reproductibilité des valeurs d'isothermes de sorption obtenues dans l'enceinte conditionnée.*

Divers essais ont été effectués afin d'apprécier le temps nécessaire pour obtenir l'équilibre hydrique entre une substance pulvérulente et l'air conditionné dans l'appareil réalisé, afin de déterminer la validité des résultats de sorption ainsi obtenus.

a) *Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre de sorption.*

La cinétique de sorption de l'eau dans les conditions opératoires utilisées est sous la dépendance d'un très grand nombre de facteurs : débit d'air, humidité relative d'équilibre, température, dimensions des particules de l'échantillon, masse de la prise d'essai par unité de surface, teneur en eau initiale de l'échantillon, enfin nature de la substance. Pour des dimensions de particules inférieures à 0,5 mm, les autres facteurs jouent surtout sur la vitesse initiale de sorption et, à un bien moindre degré, sur le temps nécessaire pour que l'équilibre soit atteint. Il n'est pas

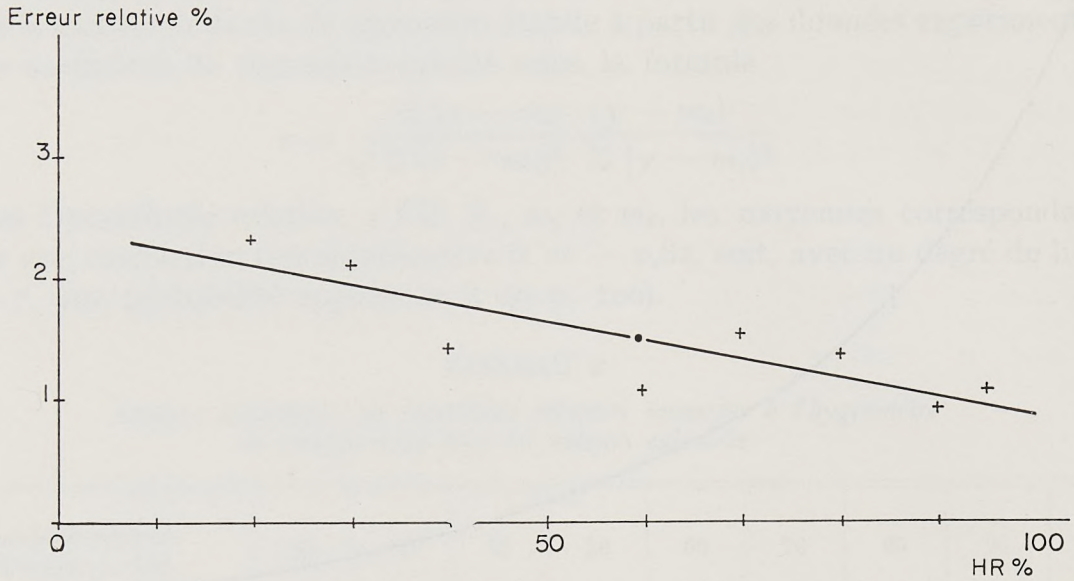


FIG. 7. — *Variation de l'erreur relative sur l'H. R. en fonction de celle-ci* (Droite des moindres carrés).

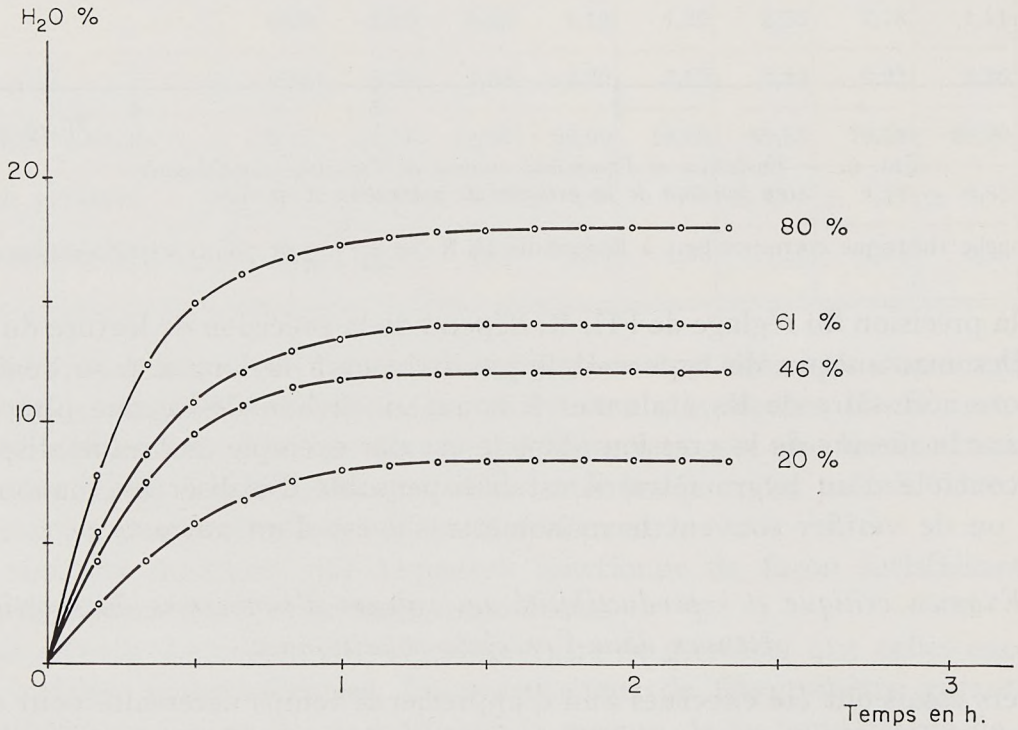


FIG. 8. — *Cinétique de sorption d'amidon de maïs pour 4 H. R. différentes* (débit : 350 l/h, température : 31°C

possible de donner de règles générales, chaque cas particulier nécessite un sondage préalable avant d'établir la courbe de sorption.

La figure 8 montre, pour différentes humidités relatives, l'aspect de la cinétique de sorption d'eau d'un amidon de maïs préalablement déshydraté sous vide vers 20°C. Les expériences ont été effectuées avec un débit d'air de 350 l/h, à une température de 30°C, avec des prises d'essai de 500 mg disposées dans des capsules de dimensions telles qu'il y avait une répartition de l'ordre de 50 mg par cm^2.

On considère que l'équilibre est atteint lorsque deux pesées successives présentent des écarts de masse inférieur à 0,1 mg. La durée nécessaire pour atteindre l'équilibre est de l'ordre de 2 heures, quelle que soit l'humidité relative considérée. En fonction du débit d'air, cette durée évolue dans le sens indiqué par les valeurs portées dans le tableau 3.

Dans les mêmes conditions, avec un débit de 800 l/h, des grains de maïs et de blé préalablement broyés pour obtenir des dimensions de particules inférieures à 0,7 mm demandent, pour être en équilibre, respectivement 3 et 5 h au lieu du temps de 1 h à 1 h. 30 nécessaire dans le cas de l'amidon.

C'est pourquoi, afin d'assurer une marge de sécurité suffisante, le temps de séjour des échantillons dans l'étuve conditionnée a été fixé en pratique à au moins 8 h.

b) *Reproductibilité et validité des isothermes de sorption.*

Dans le but d'étudier ces caractéristiques, une série d'expériences indépendantes a été effectuée à 30°C, avec l'amidon de maïs. Le mode opératoire utilisé pour l'établissement de ces courbes de sorption est décrit plus loin en détail (méthode 1). Après obtention de l'équilibre hydrique entre l'air et la substance, la teneur en eau a été mesurée par dessiccation à 100-105°C, pendant 16 h, dans une étuve à air préalablement conditionné par passage dans un réservoir maintenu à 0°C [1].

TABLEAU 3

Temps nécessaire à l'obtention de l'équilibre de sorption de l'amidon de maïs à 30°C, en fonction du débit

Débit (l/h)	200	400	600	1 000
Temps (heures)	3	2	1,5	1

Méthodes analytiques des céréales (1958). La reproductibilité du dosage est en valeur absolue de ± 0,05 à ± 0,1 p. 100. La teneur en eau de l'amidon est exprimée par rapport à la substance sèche. L'humidité relative a été déterminée à l'hygromètre avec la précision précédemment indiquée.

[1] Ce type d'étuve est fabriqué par les Ets Chopin (Hygro-étalon Chopin).

L'analyse statistique des résultats est présentée dans le tableau 4.

TABLEAU 4

Analyse statistique des teneurs en eau d'amidon de maïs mis en équilibre avec différentes humidités relatives dans l'étuve conditionnée.

Humidité relative théorique p. 100	20	30	40	50	60	70	80	90	95
Nombre d'expériences	10	10	10	10	9	10	10	10	6
Variance	0,15	0,09	0,07	0,04	0,01	0,021	0,04	0,66	0,20
t au risque 5 %	2,26	2,26	2,26	2,26	2,30	2,26	2,26	2,26	2,57
Teneur en eau moyenne % .	8,09	9,89	11,51	12,99	14,52	16,09	18,28	21,08	23,89
Intervalle de confiance	± 0,27	± 0,21	± 0,19	± 0,14	± 0,07	± 0,03	± 0,14	± 0,58	± 0,48
Incertitude relative %	3,34	2,12	1,65	1,08	0,50	0,187	0,69	2,76	2,01

Il apparaît que la teneur en eau de l'échantillon à l'équilibre est connue avec une erreur absolue variant de ± 0,03 à 0,58 p. 100. Cette erreur standard dépasse en général la précision de la méthode de dosage de l'eau et se trouve probablement due aux fluctuations d'H. R. La figure 9 représente la variation de l'erreur relative sur la teneur en eau en fonction de l'H. R. : on voit que cette erreur passe par une valeur minimale pour une H. R. de 70 p. 100 environ. Ce phénomène trouve sans doute son explication dans le fait que, d'une part, aux basses H. R., l'erreur sur la

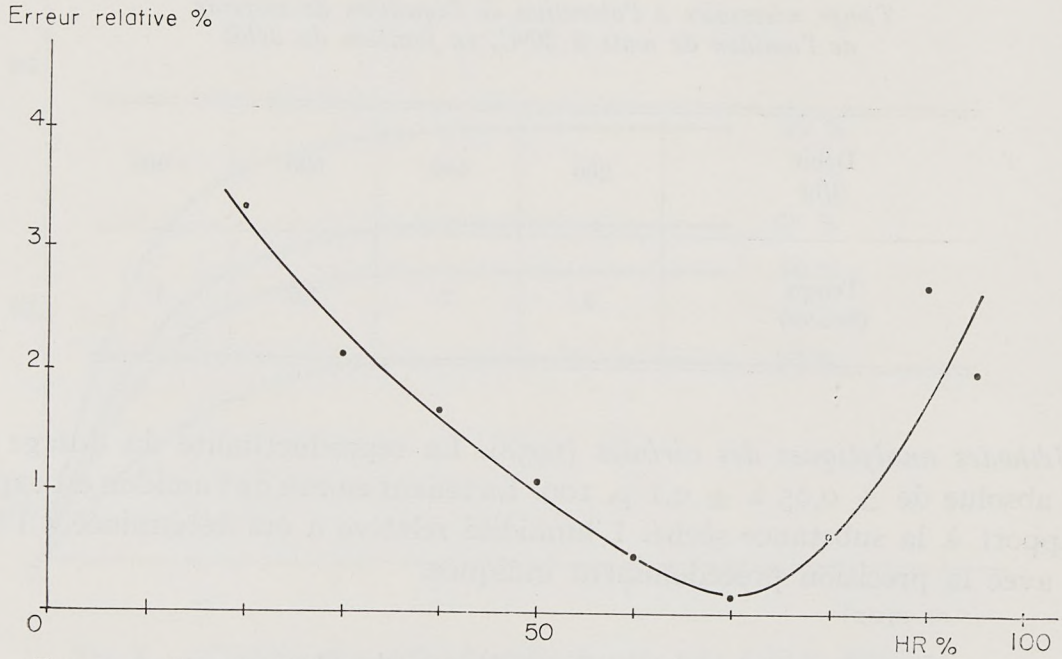


FIG. 9. — *Erreur relative sur la teneur en eau des échantillons en fonction de l'H. R.*

régulation d'H. R. est la plus importante (Cf. fig. 7), d'autre part, aux basses et plus encore aux hautes H. R., l'erreur au moment de la pesée est la plus forte, l'échantillon tendant à se mettre en équilibre avec l'air ambiant du laboratoire (malgré la fermeture du vase à échantillon) ; par contre, pour les raisons inverses, aux environs de 60-70 p. 100, l'erreur sur la teneur en eau est la plus faible.

Par ailleurs, nous avons vérifié que le débit d'air n'a pas d'influence significative, entre 200 et 800 l/h, sur les valeurs de teneurs en eau au moment de l'équilibre. Les écarts entre les résultats indiqués dans le tableau 5, pour chaque humidité relative considérée, sont de l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales et ne présentent aucun sens de variation systématique.

TABLEAU 5

Teneurs en eau des échantillons en équilibre avec 3 humidités relatives et 3 débits différents

		H. R. p. 100		
		20	50	80
Débit (l/h)	200	8,00	13,11	18,25
	400	8,15	13,00	18,63
	800	8,41	12,84	18,27

Les moyennes des valeurs d'humidités relatives et teneurs en eau sont rassemblées dans le tableau 6 et la courbe de sorption correspondante est représentée sur la figure 10.

TABLEAU 6

Isothermes de sorption établies dans l'étuve conditionnée. Valeurs moyennes d'humidité relative et de teneur en eau en équilibre.

Humidité relative théorique %	20	30	40	50	60	70	80	90	95
Humidité relative réelle %	20,34 ± 0,47	29,73 ± 0,63	39,50 ± 0,56	50,09 ± 0,80	59,89 ± 0,65	69,85 ± 1,08	79,49 ± 1,10	88,90 ± 0,85	94,70 ± 1,07
Teneur en eau %	8,09 ± 0,27	9,89 ± 0,21	11,51 ± 0,19	12,99 ± 0,14	14,52 ± 0,07	16,09 ± 0,03	18,28 ± 0,14	21,08 ± 0,58	23,89 ± 0,48

Pour apprécier la validité des résultats de sorption ainsi obtenus, nous les avons comparés avec ceux fournis par la méthode « gravimétrique » mettant en œuvre un conditionnement d'air à l'aide de solutions d'acide sulfurique, sous un vide partiel destiné à accélérer la diffusion de la vapeur d'eau, et selon le mode opératoire décrit

par DRAPRON et GUILBOT (1955). Cette méthode, largement utilisée, est en effet considérée comme une des plus sûres aux températures voisines de 20°C, entre 5 et 90 p. 100 d'humidité relative.

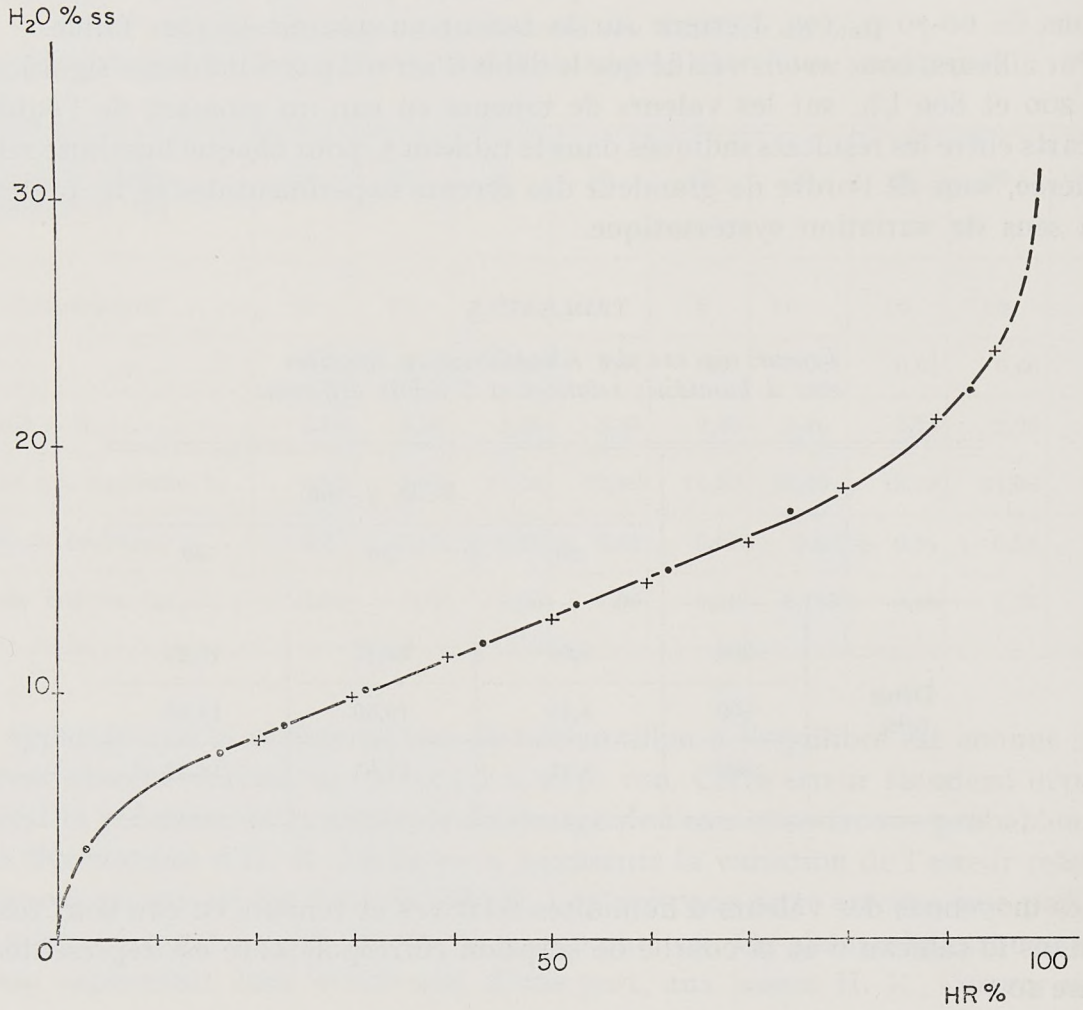


FIG. 10. — *Isotherme de sorption d'amidon de maïs établie à 30°C*
a) dans l'étuve conditionnée (+)
b) par la méthode de sorption sur acide sulfurique (·)

Les valeurs de sorption déterminées avec la méthode 2 sont représentées sur le graphique 10. On constate que les écarts observés entre les résultats obtenus par les deux techniques sont du même ordre de grandeur que les erreurs expérimentales Ceci permet de conclure que les deux méthodes donnent des résultats équivalents, aux erreurs expérimentales près.

IV. — MODE OPÉRATOIRE PROPOSÉ

Compte tenu des déductions faites au cours de l'étude critique de la méthode, voici le mode opératoire qui a été adopté, dans le cas de la détermination des isothermes de sorption de l'eau.

A — *Préparation et prélèvement de l'échantillon*

Broyer finement les substances non pulvérulentes pour obtenir des dimensions de particules inférieures à 0,7 mm en prenant toutes précautions pour éviter un classement ou un choix privilégié des parties broyées.

1. Dans le cas d'une sorption, les pesées étant effectuées sur une balance au 1/100 mg, introduire environ 500 mg de substance dans un vase d'aluminium comportant un couvercle, taré après séchage dans une étuve et refroidissement dans un dessiccateur.

Faire sécher les échantillons, en présence de P_2O_5, sous vide (15 à 20 mm Hg), vers 20°C, jusqu'à ce que leur teneur en eau résiduelle soit inférieure à 1 p. 100.

2. Dans le cas d'une désorption d'un produit insoluble, mettre la substance en suspension dans l'eau, puis centrifuger. Disposer en couche mince environ 1 g du culot de centrifugation, dans les nacelles préalablement tarées comme cela a été indiqué plus haut.

B — *Réglage de l'étuve de conditionnement et mise en sorption des produits*

Le cas échéant, mettre en fonctionnement les dispositifs d'enregistrement de la température sèche et de la température de rosée. L'étuve ayant atteint son équilibre thermique à la température désirée, amener la température du saturateur à une valeur de 1°C supérieure à celle de l'étuve.

Régler le débit d'air à une valeur comprise entre 500 et 800 l/h. Amener l'H. R. à la valeur convenable, soit à 20 p. 100 H. R. pour une sorption, soit à 90 p. 100 pour une désorption.

Placer alors le vase contenant l'échantillon dans une alvéole de l'étuve, le laisser un temps suffisant pour que l'équilibre soit atteint (écart entre deux pesées successives inférieur à 0,1 mg). Au moment de la pesée, on devra placer le couvercle sur la capsule, celle-ci étant encore dans l'étuve, et effectuer la pesée aussi rapidement que possible sur la balance au 1/100 de mg.

Après obtention de la constance de masse, replacer l'échantillon dans l'étuve réglée à l'humidité relative désirée, supérieure ou inférieure à la précédente selon que l'on opère en sorption ou désorption.

C — *Détermination de la teneur en eau du produit en équilibre*

Lorsque la gamme d'H. R. a été parcourue par la prise d'essai, déterminer la matière sèche de celle-ci par dessiccation selon l'une des méthodes décrites dans *Méthodes analytiques des céréales.*

D. *Calculs*

1. *Teneur en eau.*

Si m est la masse de la matière sèche, m_1, m_2,... les masses de matière sèche + eau fixée aux humidités relatives H. R.1, H. R.2,..., les teneurs en eau correspondantes sont égales à

$$\frac{m_1 - m}{m} \times 100, \frac{m_2 - m}{m} \times 100$$

2. *Humidité relative.*

t_s étant la température sèche moyenne des quatre alvéoles,
t_r étant la température de rosée,
lire dans les tables les pressions de vapeur d'eau saturante correspondantes p_s et p_r.

L'humidité relative est égale à : $\frac{p_r}{p_s} \times 100$.

E — *Remarques*

1. Lorsqu'une durée de huit heures est suffisante pour atteindre l'équilibre hydrique, il est possible d'obtenir neuf points de la courbe en cinq jours ; pour cela il faut réaliser les équilibres successifs au rythme de 1 par jour et 1 par nuit.

Trois vases à prélèvements pouvant être placés dans chaque alvéole, les courbes de sorption de 12 échantillons sont établies en une semaine.

2. Si une très grande précision est requise, il est préconisé de procéder ainsi :

— calculer l'H. R. exacte de chaque alvéole, au lieu de prendre la valeur moyenne ;

— placer dans l'étuve 10 échantillons et établir ainsi 10 isothermes de la même substance ; ceci est rendu possible, sans que le travail expérimental ne soit trop lourd, grâce à la rapidité de la méthode décrite et à son adaptation au travail en série.

On prendra ensuite pour chaque point la valeur moyenne, affectée de l'intervalle de confiance calculé par la méthode statistique classique des petits échantillons.

3. Il est possible d'utiliser un courant d'azote à la place de l'air comprimé ; ceci présente un gros avantage avec des produits oxydables, par exemple.

4. L'étalonnage d'un hygromètre à sonde de petite dimension est chose facile dans cette étuve : il suffit de placer la sonde dans une alvéole et de comparer ses données aux indications de l'hygromètre à point de rosée.

V. — CONCLUSION

Une étuve à air conditionné a été réalisée sur le principe de la détente isotherme d'un air préalablement saturé d'eau sous une pression donnée ; l'étude critique de son emploi pour l'établissement des équilibres de sorption a permis de montrer l'excellente reproductibilité et la validité des résultats obtenus avec cet appareillage.

Compte tenu de la possibilité d'effectuer rapidement plusieurs sorptions simultanées, d'opérer éventuellement sous gaz inerte, et d'obtenir des équilibres en moins de huit heures, cette technique apparaît comme particulièrement bien adaptée à l'étude de la sorption et au conditionnement en humidité de produits biologiques fragiles, dans la gamme d'H. R. de 20 à 95 p. 100 et pour des températures situées entre 0 et 70°C environ.

D'autres utilisations pourront être envisagées ultérieurement.

Reçu pour publication en novembre 1966

REMERCIEMENTS

Travail effectué grâce à la subvention de la Délégation Générale à la Recherche scientifique et technique (contrat 64-FR-024 du Comité Technologie Agricole) à laquelle nous adressons nos plus vifs remerciements.

SUMMARY

METHOD FOR QUICK DETERMINATION OF WATER VAPOR SORPTION ISOTHERMS.

A small capacity, air conditioned, oven is described, with the relative humidity and temperature checking apparatus, allowing to make up vapour sorption isotherms of products by a gravimetrical method.

The critical, theorical and experimental study of R. H. and moisture equilibrium results from the products subjected to sorption allows to show that reproductibility ranges about 1 p. 100 in relative value.

The isotherms obtained with this equipment coincide with the ones made up according to the classical method using properly titrated sulphuric acid solutions. An operating process is offered allowing to obtain 12 complete isotherms in 5 days.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ACKER L., 1963. Enzyme activity at low water contents. *Rec. Adv. in Food Science*, **3**, 239-247.

AMDUR J. E., WHITE R. W., 1965. Two pressure relative humidity standards *in* Humidity and Moisture, **111**, 445. Reinhold publishing, N. Y.

C. N. E. R. N. A., 1958. Méthodes analytiques des céréales, farines et autres produits dérivés. *Cah. tech. C. N. E. R. N. A.*, **111**, 171-186, C. N. R. S., Paris.

COPPENS R., WEI H. P., 1954. La détermination du point hygroscopique et de la courbe d'hygroscopicité en fonction de la teneur en eau dans les produits agricoles à sécher. *Ann. de Gembloux*, **4**, 225-236.

DRAPRON R., GUILBOT A., 1962. Contribution à l'étude des réactions enzymatiques dans les milieux biologiques peu hydratés. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 3. 175-218.

GAC A., 1955. *Contribution à l'étude de l'influence de l'humidité relative et de la vitesse de circulation de l'air sur le comportement des fruits cueillis.* Thèse d'Ingénieur-Docteur. Imprimerie nationale, Paris.

FISHER R. A., YATES F., 1953. *Statistical tables for biological, agricultural and medical research.* 4e Éd., Oliver and Boyd, Edinburgh.

GOERLING P., 1954. *Untersuchungen zur Aufklärung des Trocknungsverhaltens pflanzlicher Stoffe, insbesondere von Kartoffelstücken.* Thèse T. H. Darmstadt.

GUILBOT A., 1964. Les méthodes biochimiques de contrôle analytique dans les industrie de céréales. *Mises au point. Chim. analyt. pure appl.*, 1-40, 12e série, Masson, Paris.

GUILBOT A., DRAPRON R., 1965. Évolution des réactions enzymatiques en milieu peu hydraté. *8e Symposium sur les matières étrangères dans les aliments.* (BIPCA-CIIA) Varsovie.

GUILBOT A., LINDENBERG A. B., 1960. Eau non solvante et eau de sorption de la cellule de levure. *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 389-397.

GUILBOT A., CHARBONNIÈRE R., DRAPRON R., 1961. Sur la contribution de l'eau à l'organisation des chaînes macromoléculaires de l'amidon. *Stärke* **13**, 6, 204-207, et résultats inédits.

GUR-ARIEH C., NELSON A. I., STEINBERG M. P., 1965. Water activity of flour at high moisture contents as measured with a pressure membrane cell. *J. Food Sci.*, **30**, 2.

KNEULE F., 1964. *Le séchage.* Eyrolles, Paris.

KUPRIANOFF J., 1965. Probleme der Warmeübertragung bei der Lebensmittelverarbeitung. *Dechema-Monographien*, **56**, 1-23.

LEA C. H., HANAN R. S., 1949. Studies of the reaction between proteins and reducing sugars in the dry state. *Biochim. Biophys. Acta.*, **3**, 313-325.

LONCIN M., LENGES J., BIMBENET J., JACQMAIN D., 1965. L'humidité relative d'équilibre, son importance et sa mesure. *Industr. aliment. agric.*, **82**, 9-10, 923-27.

MAC BAIN J. W., BRITTON G. T., 1930. *J. amer. chem. Soc.*, **52**, 2198.

MACEY H. H., 1942. Clay-water relationships. *Trans. brit. Cer. Soc.*, **41**, 73-121.

MULTON J.L., GUILBOT A., La régulation de l'humidité relative dans les cellules de faible volume. A paraître.

PICHLER H. J., 1956. Sorption isotherms for grain and rape. *Landtech. Forsch.*, **6**, 2, 47-52.

POERSCH, 1963. Sorption Isothermen. Ihre Ermittlung und Auswertung. *Stärke*, **15**, 11, 405-412.

POISSON J., GUILBOT A., 1963. Conditions de stockage et durée de conservation des grains. *Meun. fr.*, 163.

SCOTT W. I., 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. in *Advance in Food Res.*, **7**, 84-123. Academic Press Inc. N. Y.

TAYLOR A. A., 1961. Determination of moisture equilibria in dehydrated foods. *Food Technol.*, **15**, 12, 536-540.

WEAVER E. R., RILEY R., 1948. Measurement of water in gases by electrical conduction in a film of hygroscopic material and the use of pressure changes in calibration. *J. Res. nation. Bur. Stand.*, U. S. A. **40**, 169-214.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (1), 27-34.

VARIATIONS QUANTITATIVES DES ACIDES ORGANIQUES STABLES, NON CÉTONIQUES, NON VOLATILS, DANS LES BAIES DE RAISIN PLACÉES EN ANAÉROBIOSE CARBONIQUE

I. — Influence de la température

C. FLANZY, P. ANDRÉ, M. FLANZY, Y. CHAMBROY
avec la collaboration technique de Geneviève Migliori

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est, 84 - Montfavet;
Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne

---

SOMMAIRE

Ce mémoire a pour objet de préciser l'évolution, sous l'influence de la température, des acides organiques du raisin, placé en anaérobiose carbonique. La cinétique de cette évolution est examinée dans un deuxième mémoire. (1)

INTRODUCTION

L'étude biochimique de la vinification dite par « Macération Carbonique » peut être entreprise au moyen de recherches sur les métabolismes intracellulaires des baies de raisins mûres, placées dans des enceintes dont l'atmosphère est saturée de CO_2. De nombreux travaux effectués sur des fruits divers : pommes (Hulme, 1959), poires (Ulrich et *al.*, 1956 ; Williams et *al.*, 1964), citrons (Young, 1962 ; Biale 1964), conservés en atmosphères conditionnées, ont montré l'intérêt que présente l'étude du métabolisme des acides organiques pour une meilleure connaissance de la fermentation intracellulaire.

En ce qui concerne le raisin, placé dans de telles conditions, les données de la littérature, pour le domaine particulier des acides organiques, sont très fragmentaires (Garino Canina, 1958 ; Peynaud et *al.*, 1962 ; Chauvet et *al.*, 1963).

(1) Ce mémoire paraîtra dans le numéro 2, 1967 des *Annales de Technologie agricole.*

En outre deux différences essentielles existent entre les recherches concernant les fruits autres que le raisin et les nôtres :

Pour nous il s'agit de transformer le raisin et non pas de le conserver, comme c'est le cas pour d'autres fruits charnus ; d'autre part, les raisins baignent dans une atmosphère constituée en majeure partie par du CO_2 alors que, souvent, les fruits charnus subissant une fermentation intracellulaire durant leur conservation se trouvent dans des atmosphères pauvres en CO_2 (2,5 p. 100) ou enrichies en CO_2 (10 p. 100).

Il n'est donc pas certain que les métabolismes dont le raisin est le siège en anaérobiose carbonique soient identiques à ceux que l'on note pour les autres fruits placés dans une atmosphère conditionnée de conservation.

Aussi, il a paru fondamental d'entreprendre l'étude, parallèlement à celle de la fermentation intracellulaire proprement dite, des variations des acides organiques dans des baies placées en anaérobiose carbonique.

Les variations des acides sous l'influence de la température de macération sont rapportées ici ; leur évolution est donnée dans un deuxième mémoire.

MÉTHODES ET TECHNIQUES. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Cent kilos de *Grenache noir* sont cueillis, dans une vigne de Châteauneuf-du-Pape, en sélectionnant sur souches des grappes de même exposition, de maturité apparemment identique, exemptes de moisissures. Le matériel végétal est divisé en 52 lots, de la manière suivante : des baies, de volume moyen, sont prélevées sur les grappes, séparées du pédicelle au ras du bourrelet et distribuées à raison d'une à deux baies par lot. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un ensemble de 445 ± 5 grains par lot, relativement homogène, de poids moyen 1 005 g. Les différents lots sont placés dans des bocaux Keller de 1,5 l remplis de CO_2, puis répartis en trois séries correspondant aux températures de macération choisies : 15°C — 25°C — 35°C.

Après 5, 10, 17, 31 jours de macération, les raisins de 2 bocaux d'une même série, ayant donc macéré à la même température, sont pressurés séparément au pressoir pneumatique sous une pression de 3 kg/cm². Des parties aliquotes des deux moûts obtenus sont mélangées, puis 100 ml de ce mélange sont fixés deux minutes dans l'éthanol bouillant.

Les solutions éthanoliques sont purifiées par passages successifs sur des résines cationiques puis anioniques. Les teneurs en acides organiques sont déterminées par chromatographie de partage sur gel de silice (Bové et Raveux, 1957) et par chromatographie d'échanges d'ions sur Dowex 1 × 10, 200-400 mesh, forme formiate (Fauconneau, 1956).

Un contrôle de la nature des acides isolés est effectué par chromatographie sur papier et révélation au vert de bromocrésol. Les détails de la technique utilisée sont donnés par Roux-Lesaint (1959).

L'acidité organique de la solution éthanolique représente environ 70 à 80 p. 100 de son acidité totale, titrée après passage sur la résine cationique. Les teneurs en acides organiques sont exprimées en microéquivalent (μ éq.) par litre de jus, obtenu dans les conditions de pressurage décrites ci-dessus. Les valeurs données pour les acides fumarique, citrique, malonique, glycolique, sont celles obtenues par séparation sur silice. Les valeurs relatives à l'acide malique représentent les moyennes des résultats, très voisins, des analyses par chromatographie sur silice et sur Dowex. Les teneurs en acide succinique pouvant être surestimées dans la séparation sur silice par la présence d'acide tartrique, les valeurs données pour cet acide sont celles obtenues par séparation sur Dowex. Les teneurs en acide tartrique, shikimique et quinique mélangés, sont celles déterminées par chromatographie sur Dowex.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus sont résumés sur la figure 1 et dans les tableaux 1 à 5.

— La figure 1 représente les variations des concentrations des moûts en acides malique, succinique, quinique + shikimique. Pour faciliter les calculs ultérieurs,

nous avons redonné les valeurs de ces acides dans le tableau 1 et nous y avons ajouté les variations en acide tartrique, citrique, fumarique. A la suite d'une mauvaise extraction, les valeurs données pour les acides tartrique et citrique ne sont qu'approximatives.

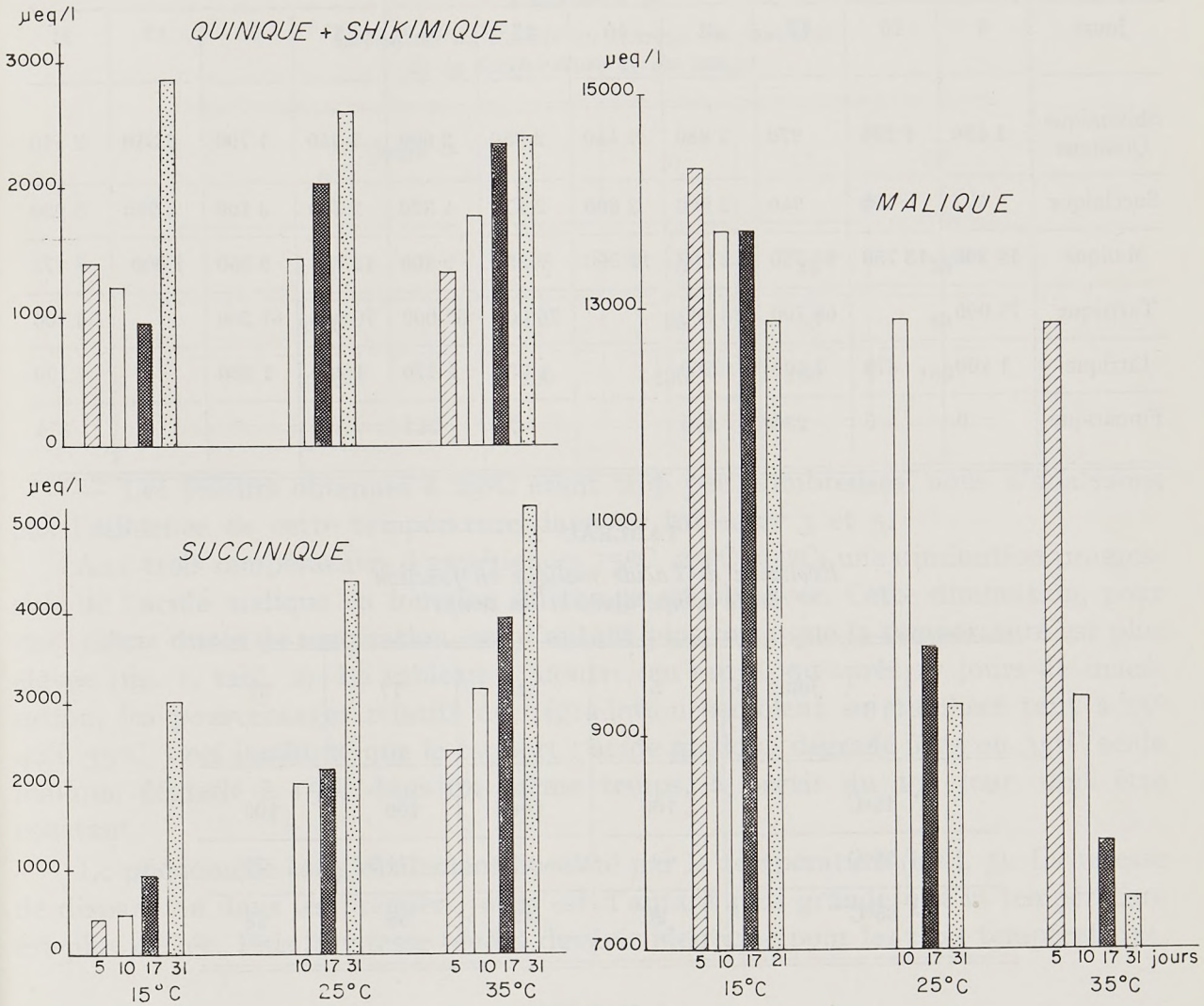


FIG. 1.

— Le tableau 2 donne les calculs des pourcentages en acide malique, la référence 100 étant celle des lots placés à 15°C. Le tableau 3 est établi après calcul du taux d'acide malique disparu, pour une même température, après chaque durée de macération.

— Les pertes totales p. 100 correspondent à la somme des pertes à une date donnée d'échantillonnage. Les bases de référence sont les teneurs en acide malique au 5e jour.

— Les pertes partielles p. 100 correspondent à la diminution de teneur en acide malique entre deux dates d'échantillonnage.

— Les pertes partielles p. 100 journalières donnent une idée de la vitesse de disparition de l'acide malique.

TABLEAU 1

Évolution de certains acides organiques
(en μ éq. d'acide par litre de jus)

θ	15°C				25°C			35°C			
Jours	5	10	17	31	10	17	31	5	10	17	31
Shikimique Quinique	1 430	1 235	970	2 880	1 450	2 050	2 600	1 350	1 790	2 340	2 410
Succinique	407	490	940	2 960	2 000	2 170	4 370	2 370	3 100	3 930	5 250
Malique	14 300	13 750	13 750	12 900	12 900	9 850	9 300	12 850	9 350	8 000	7 475
Tartrique	74 000		68 700	68 800		76 000	62 000	70 000	61 200		55 400
Citrique	1 400	870	1 100	1 500		1 030	1 170	1 300	1 200		1 100
Fumarique	0	0	280	170		75	242	465			374

TABLEAU 2

Évolution de l'acide malique en fonction de la température et du temps

Jours → / θ ↓	5	10	17	31
15°C	100	100	100	100
25°C	—	94	71,5	72
35°C	90	68	58	58

TABLEAU 3

Évolution du taux et de la vitesse de disparition de l'acide malique

Jours	15°C			35°C		
	Perte p. 100		v	Perte p. 100		v
	totale	partielle		totale	partielle	
10	4	4	0,8	27	27	5,4
17	4	0	0	38	11	1,6
31	10	6	0,42	42	4	0,28

— Le tableau 4 donne le calcul des pourcentages en acide succinique, la référence 100 étant celle des lots placés à 35°C. Le tableau 5 montre le taux d'augmentation de l'acide succinique à une même température pour des durées variables de macération. Ce tableau donne en outre une idée des vitesses d'accumulation de l'acide.

TABLEAU 4

Évolution de l'acide succinique en fonction de la température et du temps

Jours → / θ ↓	5	10	17	31
15°C	17	16	24	56
25°C	—	65	55	83
35°C	100	100	100	100

— Les valeurs obtenues à 25°C étant trop peu nombreuses, nous n'analysons pas l'influence de cette température dans les tableaux 3 et 5.

Aux trois températures d'expériences 15°C, 25°C, 35°C, une diminution progressive de l'acide malique en fonction du temps est observée. Cette diminution, pour une même durée de macération, est d'autant plus forte que la température est plus élevée (fig. 1, tabl. 2). Le tableau 2 montre, en outre, qu'après 17 jours de macération, les pourcentages relatifs de dégradation semblent se stabiliser tant à 25° qu'à 35°C. Ceci implique que le rapport : acide malique dégradé à 25 ou 35°C/acide malique dégradé à 15°C dans un même temps, à partir du 17e jour, doit être constant.

Le phénomène est globalement accéléré par la température (tabl. 3). La vitesse de disparition dans les premiers jours est d'autant plus grande que la température est plus élevée. Puis la vitesse tend à devenir identique pour les trois températures.

TABLEAU 5

Évolution du taux et de la vitesse d'accumulation de l'acide succinique

Jours	15°C			35°C		
	Gain p. 100		*v*	Gain p. 100		*v*
	total	partiel		total	partiel	
10	22	22	4	31	31	6
17	130	108	15	66	35	5
31	625	495	35	120	54	3,8

Aux trois températures de 15°C, 25°C, 35°C, il est constaté, en fonction du temps de macération, une forte augmentation de la teneur en acide succinique (fig. 1). Cette augmentation, pour une même durée de macération, est d'autant plus grande que la température est plus élevée (tabl. 4).

Le phénomène d'accumulation est davantage accéléré à 15°C qu'à 35°C, entre 5 et 31 jours (tabl. 5). Or, la vitesse d'accumulation croît, à 15°, avec la durée de macération alors qu'elle diminue à 35°, entre 5 et 31 jours.

En associant cette observation au fait que la quantité totale d'acide succinique produite est bien supérieure pour 35° à celle produite à 15°, on peut supposer que la vitesse de formation entre 0 et 5 jours est très grande à 35° et réduite à 15°C. Ceci se vérifie en remarquant que la production d'acide succinique entre 0 et 5 jours est d'environ 6 fois plus forte à 35° qu'à 15°C.

En conclusion, il semble qu'à haute température la production d'acide succinique, après une forte accélération initiale, voit sa vitesse diminuer avec le temps de macération. Au contraire, à 15°, après un démarrage lent, la production est accélérée. On ne peut en déduire qu'à la limite théorique les deux productions se rejoindraient.

Les concentrations en acides fumarique et citrique sont sensiblement égales aux trois températures considérées.

On observe des variations faibles en acide citrique et une légère élévation des concentrations en acide fumarique, après les premiers jours de macération.

Les variations de l'ensemble quinique + shikimique diffèrent selon la température de macération. Leurs teneurs s'élèvent à 25° et 35°C, diminuent puis augmentent à 15°C. Les variations observées à 15°C semblent en accord avec celles constatées par HULME (1958).

Les teneurs en acide tartrique semblent décroître avec le temps de macération à des températures égales ou supérieures à 25°C. Cette constatation rejoint les observations de BÉNARD et JOURET (1963). La diminution est d'autant plus importante que la température est plus élevée. Cela est à relier aux observations de M. FLANZY (1946), puis OURNAC (1952).

Cette disparition métabolique ne peut être confondue avec des phénomènes de précipitations de bitartrate puisque ces derniers sont d'autant plus importants que la température est plus basse, contrairement au phénomène biochimique.

CONCLUSION

Sur le plan technologique, on peut conclure que, dans des baies de raisin placées en anaérobiose carbonique, la diminution de l'acidité totale initiale sera d'autant plus grande que la température sera plus élevée.

La diminution de concentration de l'acide tartrique à des températures au moins égales à 25°C mérite d'être précisée. En effet, ce phénomène est intéressant, tant du point de vue technologique, où il participe à la variation d'acidité totale au cours de la fermentation intracellulaire, que du point de vue biochimique où il serait utile de connaître les voies métaboliques de dégradation de l'acide tartrique dans nos conditions expérimentales.

L'évolution des acides shikimique + quinique semble, en fermentation intra-

cellulaire et dans le métabolisme des fruits stockés à température relativement basse, très intimement liée à la température. On peut supposer que les variations dans l'évolution des fruits stockés à 15°C et les différences observées dans l'évolution de ceux placés à 25° ou 35°C sont dues à la présence de voies métaboliques coexistantes ; mais les vitesses de réaction pourraient varier différemment de l'une à l'autre en fonction de la température et de la durée d'action de cette température.

L'importance de ce phénomène et son incidence pratique sur la fermentation intracellulaire sont envisagées dans la 2e publication.

L'évolution des acides du cycle de Krebs est caractérisée par une forte baisse de la concentration en acide malique, une faible variation de l'acide citrique, une légère élévation de l'acide fumarique et une accumulation d'acide succinique. Cette dernière accumulation conduit à faire deux remarques :

— Le pourcentage de production d'acide succinique étant bien supérieur au pourcentage de dégradation de l'acide malique, on pourrait penser qu'il n'y a pas de filiation directe malique-succinique au cours du phénomène de fermentation intracellulaire. Ceci rejoindrait les conclusions des différents expérimentateurs ayant employé du malate marqué comme précurseur lors d'essais sur la conservation des fruits en atmosphère conditionnée (Ranson, 1953 ; Williams-Patterson, 1964).

Mais la teneur en acide malique étant très élevée par rapport à celle d'acide succinique, la filiation pourrait se faire avec des vitesses de réaction plus ou moins élevées.

— Les valeurs globales d'acide succinique trouvées dans nos essais sont nettement inférieures aux teneurs d'acide succinique données par la littérature dans le cadre des produits secondaires de la fermentation alcoolique par la levure. Existe-t-il une relation étroite entre le degré atteint (donc la quantité de sucre dégradé) et la quantité de succinique élaboré ? Nous envisagerons cette possibilité lors de la discussion concernant la métabolisation de l'acide succinique (C. Flanzy et *al.*, 1967, II).

Reçu pour publication en décembre 1966.

REMERCIEMENTS

Nous avons pu effectuer les analyses d'acides organiques dans les laboratoires de la Station centrale de Physiologie végétale, I. N. R. A. Nous remercions le Directeur et le Personnel de la Station pour l'amabilité de leur accueil et les conseils qu'ils nous ont prodigués.

SUMMARY

QUANTITATIVE VARIATIONS IN NON-KETONIC, NON-VOLATILE STABLE ORGANIC ACIDS IN GRAPE BERRIES UNDER CARBONIC ANAEROBIOSIS
I. THE EFFECT OF TEMPERATURE

The effect of temperature on the production of malic, succinic, citric, fumaric and tartaric acids, and of the mixture of quinic and shikimic acids was observed in grape berries under carbonic anaerobiosis while undergoing intracellular fermentation.

The decrease in initial total acidity is the greater the higher is the temperature.

The degrading of malic acid and the accumulation of succinic acid are increased at higher temperatures.

The development of citric and fumaric acids does not seem to depend upon temperature.

The metabolism of quinic and shikimic acids is strongly linked with temperature.

Tartaric acid seems to be strongly degraded at 35°C.

RIASSUNTO

L'influenza della temperatura sull'evoluzione degli acidi malico, succinico, citrico, fumarico, tartarico, della miscela degli acidi chiuicoshichimico è studiata nelle bacche di uva messe in anaerobiosi carbonica e che subiscono la fermentazione intracellulare.

La diminuzione dell'acidità totale iniziale è tanto più importante che la temperatura è più alta.

La degradazione del acido malico e l'accumulazione del acido succinico sono accelerate quando la temperatura aumenta.

L'evoluzione degli acidi citrico e fumarico non sembra dipendere della temperatura.

Il metabolismo degli acidi chinico e shichimico è legatissimo alla temperatura.

L'acido tartarico sembra essere fortemente danneggiato a 35°C.

RESUMEN

La influencia de la temperatura sobre la evolución de los ácidos málico, succínico, cítrico, fumàrico, tàrtrico, del conjunto de los ácidos quínico-shikimico esta seguida in las bayas de uvas puestas in anaerobiosis carbónico y sufriedo la fermentación intracelular.

La disminución d'acidez total inicial esta tanto más grande cuanto la temperatura esta más elevada.

La degradación del ácido málico y el acumulación del ácido succínico estan activadas cuando la temperatura se eleva.

La evolución de los ácidos cítrico y fumárico no parece depender de la temperatura.

El metabolismo de los ácidos quínico y shikimico esta muy en relación con la temperatura.

El ácido tártrico parece muy fuertemente degradecido a 35°C.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BÉNARD P., JOURET C., 1963. Essais comparatifs de vinification en rouge. *Ann. Technol. agric.*, **12**, n° 2, 85-102.

BIALE J. B., 1964. Growth, maturation and senescence in Fruits. *Science*, **146**, 3646.

CHAUVET J., BRÉCHOT P., DUPUY P., CROSON M., IRRMANN R., 1963. Évolution des acides malique et lactique dans la vinification par macération carbonique de la vendange. *Ann. Technol. agric.* **12**, n° 4, 237-246.

COÏC Y., LESAINT Mme C., LEROUX Mme F., 1961. Comparaison des feuilles, entrenœuds et nœuds du blé au point de vue acides organiques et cations minéraux peu avant la floraison. *C. R. Acad. Sci.*, **252**, 4031-4033.

FAUCONNEAU G., 1958. Les acides organiques des plantes fourragères. *Ann. agron.* Série A *bis,Physiol. vég.*, Suppl. I, 1-13.

FLANZY M., 1946. L'indice de tartre dans les vins. Signification météorique. *Ann. agron.*, **16**, 341.

FLANZY C., ANDRÉ P., FLANZY M., CHAMBROY Y., 1967. Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. II. Influence de la durée d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.* (à paraître).

GARINO-CANINA, 1948. Fermentation vinaire avec des détails biochimiques du processus de la fermentation du moût de raisoin. *Bull. Off. internation. Vigne Vin*, **204**, 55-61.

HULME A. C., 1958. Quinic and shikimic acids in fruits. *Qual. Plant. Materiae veg.*, 468-473.

OURNAC A., 1952. Recherches sur la maturation artificielle du raisin. *Ann. Technol. agric.*, n° 1, 85-106.

PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G., 1962. Modification de la composition des raisins au cours de leur fermentation propre en anaérobiose. *Ann. Physiol. vég.*, **4**, n° 2, 161-167.

RANSON, 1953. Zymase et métabolisme des acides chez les plantes supérieures. *Nature*, 252.

RAVEUX R., BOVÉ J., 1957. La séparation et la détermination des acides carboxyliques de C_6 à C_1 par chromatographie de partage sur colonne de silice 1 et 2. *Bull. Soc. chim. Fr.*, 369 et 376.

ROUX L., LESAINT Mme C., 1959. Mise au point d'une technique de détermination des acides organiques chez les végétaux. *Ann. Physiol. vég.*, n° 1, 83-92.

ULRICH R., LANDRY Mme J., 1956. Formation d'acides organiques dans les fruits conservés en atmosphère riche en gaz carbonique. *C. R. Acad. Sci.*, 4 juin, 2757-2759.

WILLIAMS W. M., PATTERSON M. E., 1964. Non-volatile organic acids and core breakdown of Bartlett Pears. *Agric. and Food Chem.*, **12**, n° 1, 80-83.

YOUNG R. E., BIALE J. B., 1956. Cité par WILLIAMS-PATTERSON, 1964-83.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (1), 35-39.

SUR L'OXYDATION DU MOÛT DE RAISIN

I. — Activité de la polyphénoloxydase du raisin des cépages « Muscat rouge », « Dimiat », « Riesling » et « Aligoté »

T. IVANOV

Institut technologique supérieur des Industries alimentaires, Plovdiv, Bulgarie

---

SOMMAIRE

Le raisin renferme des enzymes dont l'effet catalytique engendre des processus complexes de métabolisme, étroitement liés à la qualité et à la quantité de la récolte de raisin.

Au cours du traitement du raisin, les enzymes passent dans le moût et jouent un rôle très important, en particulier, dans la technologie de préparation des vins mousseux et des vins blancs de table.

Les enzymes oxydants sont les principaux facteurs de l'oxydation du moût. C'est à eux qu'est due la couleur jaunâtre des vins blancs et leur goût oxydé et non harmonieux.

Pour prévenir les processus d'oxydation, il faut connaître à fond ces enzymes contenus dans les divers cépages de raisin et rechercher les meilleurs moyens d'inactivation, susceptibles d'être utilisés en vinification. Ces questions sont d'une importance capitale pour la technologie et ce sont elles qui feront l'objet de notre étude.

INTRODUCTION

Le problème des ferments oxydants de la vigne, du raisin, du moût et du vin, se pose de plus en plus.

Sissakian, Egorov et Afrikian (1948) ont établi que la vigne comporte divers systèmes oxydants, chaque phase de son développement étant marquée par la prédominance d'un de ces systèmes.

March et Feildmann (1957) ont établi la teneur en peroxydase, polyphénoloxydase et catalase de certaines variétés de raisin de l'U. R. S. S. en cours de mûrissement.

Suivant Dourmichidze (1950 *a*, 1950 *b*, 1955) et Rodopoulo (1950, 1953, 1954, 1957, 1962), le principal système oxydant du raisin serait la polyphénoloxydase.

Les mêmes auteurs attestent qu'au moment de la maturité technologique, le système d'oxydo-réduction du raisin présente un équilibre déterminé. Au cours du traitement du raisin, il se produit une détérioration mécanique des cellules, sans que l'activité des enzymes d'oxydation soit atteinte. Le contact prolongé du moût obtenu avec l'oxygène de l'air, la présence de tanins (polyphénols), d'enzymes oxydants et surtout de la polyphénoloxydase rompent l'équilibre établi et accélèrent les processus d'oxydation. Le mécanisme de ces processus est expliqué par BACH (1950), BOKOUTCHAVA (1954), RODOPOULO (1953-1962) et d'autres.

DEIBNER et RIFAI (1963), parlant des méthodes de détermination de l'activité de la polyphénoloxydase, passent en revue toute la littérature concernant ces questions.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Nos essais ont porté sur les cépages *Muscat rouge*, *Dimiat*, *Riesling*, *Aligoté* ; ils furent expérimentés à maturité technologique. Nous avons déterminé simultanément l'activité de la polyphénoloxydase dans des grains entiers (pépins exclus), des pellicules de la pulpe + jus et du jus seul. Pour cefaire, nous nous sommes servi de la méthode à la purpurogalline de WILLSTÄTTER et STOLL (1918, 1928), modifiée plus tard par KEILLIN et MANN (1938), décrite par BOKOUTCHEVA (1948), BOTTCHER (1961), DEIBNER et RIFAI (1963). La détermination fut effectuée au moyen du photomètre de Pulfrich (filtre de 42 et cuvette de 5 mm).

RÉSULTATS

Au moment des vendanges, nous avons prélevé des prises d'essais moyennes de chacun des cépages ci-dessus. Les examens effectués ont confirmé les différences établies entre les divers cépages. Dans le tableau 1 figurent les résultats de l'étude sur l'activité de la polyphénoloxydase [1] des premières prises d'essais.

Les données analytiques du tableau 1 montrent qu'au moment de la maturité technologique, le raisin des cépages envisagés comporte de la polyphénoloxydase active. Pour tous les cépages, l'activité de la polyphénoloxydase est la plus intense dans les pellicules des grains, puis dans la pulpe + jus et la moins intense dans le jus. Dans les pellicules du raisin des cépages *Muscat rouge*, *Dimiat*, *Riesling* et *Aligoté*, l'activité de la polyphénoloxydase est respectivement 11, 13,8, 7,2 et 6 fois plus élevée que dans la pulpe + le jus. Le jus des cépages *Riesling* et *Aligoté* dénote une activité de la polyphénoloxydase plus élevée que celle du jus des cépages *Muscat rouge* et *Dimiat*. Il en est de même de l'activité de la polyphénoloxydase dans les grains entiers, évaluée pour un gramme de substance fraîche. Quant à l'activité de la polyphénoloxydase dans les grains entiers pour un gramme d'extrait sec, c'est le cépage *Riesling* qui tient la première place, suivi des cépages *Muscat rouge*, *Aligoté* et *Dimiat*.

L'oxydation biologique du moût est conditionnée aussi par les rapports quantitatifs entre les pellicules, la pulpe et le jus de raisin. Dans des conditions égales,

[1] Conditions de l'essai : pH : 5,9 ; substrat : 1,25 g pyrogallol ; volume du mélange : 100 ml ; durée de la réaction : 5 minutes.

c'est le moût des variétés à taux élevé de pellicule qui subira l'oxydation la plus intense. Cette corrélation se traduit très bien, quoique d'une façon indirecte, par l'activité de la polyphénoloxydase dans les grains entiers, évaluée tant par rapport à la substance fraîche que par rapport à l'extrait sec. Ce sont les grains entiers du raisin de la variété *Dimiat* à taux de pellicules le moins élevé, qui dénotent l'activité de la polyphénoloxydase la moins intense, 2,07 et 10,91 mg. Le raisin de la variété *Riesling*, par contre, à taux de pellicules le plus élevé, présente l'activité de polyphénoloxydase la plus élevée, 3,84 et 21,16 mg.

TABLEAU I

Activité de la polyphénoloxydase en mg de purpurogalline

Cépage	Date de l'analyse	Grains entiers	Pellicules	Pulpe + Jus	Jus (dans 1 ml de jus)
Dans 1 g de substance fraîche					
1 *Muscat rouge*	13-10-1964	2,47	12,41	1,12	0,41
2. *Dimiat*.....	6-10-1964	2,07	17,22	1,25	0,72
3. *Riesling*	30- 9-1964	3,84	15,46	2,13	0,96
4. *Aligoté*	30- 9-1964	2,95	11,65	1,93	0,80
Dans 1 g d'extrait sec					
1. *Muscat ronge*	13-10-1964	20,89	81,91	10,28	—
2. *Dimiat*.....	6-10-1964	10,91	67,87	7,59	3,95
3. *Riesling*	30- 9-1964	21,16	73,87	11,75	6,98
4. *Aligoté*	30- 9-1964	17,59	51,42	16,67	4,69

Les résultats obtenus montrent que dans la technologie de production de vins mousseux et des vins blancs de table, on devrait prendre en considération la présence de polyphénoloxydase active sur les tanins du raisin. C'est la présence des tanins qui détermine le déroulement des processus d'oxydation dans le moût.

CONCLUSION

Les essais effectués montrent qu'au moment de sa maturité technologique, le raisin des variétés *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* et *Aligoté* comporte de la polyphénoloxydase active. Celle-ci est la plus élevée dans les pellicules du raisin, puis dans la pulpe et la moins élevée dans le jus. Pour les variétés *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* et *Aligoté*, l'activité de la polyphénoloxydase est respectivement 11, 13,8, 7,2 et 6 fois plus élevée que dans la pulpe + jus d'un gramme de substance fraîche.

Les jus des cépages *Riesling* et *Aligoté* dénote une activité de polyphénoloxydase supérieure à celle du jus des cépages indigènes *Muscat rouge* et *Dimiat*.

La variété *Riesling* tient la première place par l'activité de la polyphénoloxydase dans les grains entiers d'un gramme d'extrait sec, suivi par les variétés *Muscat rouge, Aligoté* et *Dimiat.*

Reçu pour publication en novembre 1966.

SUMMARY

OXIDATION OF GRAPE MUST. THE POLYPHENOLOXIDASE ACTIVITY OF GRAPES OF THE « MUSCAT ROUGE, » « DIMIAT (1) », « RIESLING » AND « ALIGOTÉ » VARIETIES

The main oxidizing system of the grape is polyphenoloxidase. For its determination, the purpurogallin method of WILLSTÄTTER and STOLL (1918) was used in the modification of KEILLIN and MANN (1938). The varieties *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* and *Aligoté* were used in this study. Polyphenoloxidase activity was determined in the whole grape (excluding the pips), the skins, the pulp + the juice, and the grape juice alone, obtained at technological maturity.

Polyphenoloxidase activity was greatest in the grape skins, next in pulp + juice, and least in the juice alone. For the *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* and *Aligoté* varieties, the polyphenoloxidase activity in the skins was respectively 11 — 13,8 — 7 — 2 and 6 times higher than in the pulp + juice per gram of fresh weight (2).

The juice of the *Riesling* and *Aligoté* varieties showed greater polyphenoloxidase activity than the juice of the indigenous varieties *Muscat rouge* and *Dimiat.*

The *Riesling* variety has the greatest polyphenoloxidase activity in the whole grape per gram of dry weight, followed by the *Muscat rouge, Aligoté* and *Dimiat.*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BACH A., 1950. Recueil de travaux chimiques et biochimiques. *Akad. Nauk S. S. S. R.*

BOKOUTCHAVA M., 1948. Nouvelles méthodes de détermination de la peroxydase en présence de polyphénoloxydase et de catalase. *Biokhimija,* **13**, nº 4, 360.

BOKOUTCHAVA M., 1954. Élaboration de l'arôme du thé sous l'influence des acides aminés et des tanins. *Dokl. Akad. Nauk S. S. S. R.,* **99**, 145.

BOTTCHER H., 1961. Die aktivität der peroxydase und Polyphenoloxydase in frischem Gemüse. *Lebensmitt. Unters. Forsch.,* 115/6. S 527.

DOURMICHIDZE S., 1950 *a*. La polyphénoloxydase du raisin et son rôle en vinification. *Biokhimija,* **15**, 58, AN. U. R. S. S.

DOURMICHIDZE S., TZSKARICHVILI T., 1950 *b*. Modifications des tanins du raisin au cours de sa maturation. *Biokhimija Vinodel.,* **3**, 7.

DOURMICHIDZE S., 1955. Les tanins et les anthocyanes dans les vignes et les vins. *Akad. Nauk. S. S. S. R.*

DEIBNER L., RIFAI H., 1963. I. Uber die Bestimmung der Aktivität der Polyphenoloxydase mit Hilfte der elektophotometrische Metode mit Purpurogalin. *Mitt. Rebe und Wein,* Klosterneuburg, 56.

KEILIN D., MANN T., 1938. Polyphenoloxydase, Purification, nature and Properties. *Proc.* R. *Soc., ser. B.,* 125, 187.

MARCH A., FELDMANN A., 1957. Caractéristique biochimique des différentes sortes de vignes de la région d'Odessa et des produits qu'on en retire. *Vinodel. Vinograd.,* nº 3, 15.

RODOPOULO A., 1950. Les ferments oxydants du raisin et du moût des cépages dont on prépare du champagne. *Biokhimija Vinode.,* 3, 43.

RODOPOULO A., 1953. Sur les systèmes oxydants fermentatifs et non fermentatifs des moûts et des vins. *Biokhimija Vinode.,* nº 4, 211.

RODOPOULO A., 1954. Les processus d'oxydo-réduction dans le moût de raisin et dans le vin. *Trady V. N. I. I. V. Magarach,* 4.

RODOPOULO A., 1957. L'activité des ferments oxydants au cours du traitement des cépages dont on retire du champagne. *Vinodel. Vinograd.*, nº 3 p. 12.

RODOPOULO A., 1962. *Sur les processus biochimiques en vinification.* Moscva, U. R. S. S.

SISSAKIAN N., EGOROV I., AFRIKIAN B., 1948. Les propriétés biochimiques des différentes sortes de raisin et leurs rapports avec la nature du vin. *Biokhimija Vinodel.*, nº 2 p. 7.

WILLSTATTER R., STOLL A., 1918. Uber die Peroxydase. *Justus Liebigs, Ann. Chem.*, **416**, 21.

WILLSTATTER R. 1928., Untersuchung über Enzyme B_1.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (1), 41-54.

ENRICHISSEMENT EN VITAMINE B 1 DES VINS CONSERVÉS AU CONTACT DES LIES

Andrée OURNAC, M. FLANZY

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne

SOMMAIRE

Les vins sont généralement très pauvres en vitamines B_1, alors que les levures en renferment des quantités considérables.

Au cours de la remise en suspension dans les vins finis, des lies constituées en grande partie par les levures, ces dernières laissent diffuser la vitamine qu'elles contiennent dans de grandes proportions. C'est l'étude de cette diffusion que l'on a entreprise.

INTRODUCTION

Le vin est considéré en ce qui concerne la vitamine B_1 comme une boisson ne pouvant couvrir que très faiblement les besoins de l'homme. (Genevois et Flavier, 1938-1939 ; Flavier, 1939 ; Morgan et *al.*, 1939 ; Lodi, 1943 ; Perlman et Morgan, 1945 ; Cailleau et Chevillard, 1949 ; Schanderl, 1950 ; Hall et *al.*, 1956 ; Peynaud et Lafourcade, 1957).

Les auteurs sont d'accord pour admettre que la thiamine se trouve en quantité non négligeable dans le raisin et son jus et disparaît en grande partie au cours de la fermentation, consommée par les levures. Certains auteurs signalent une légère augmentation de la teneur du vin en thiamine à la fin de la fermentation (Peynaud et Lafourcade, 1957). De Bobadilla (1954), dans une étude sur les vins de *Jerez*, vins spéciaux qui mûrissent sous un voile de levures (Flor de *Jerez*), observe, pendant la période de mûrissement, une augmentation de vitamine B_1, le « voile de flor » étant une source naturelle d'enrichissement.

D'autre part, Poux, Flanzy et Flanzy (1964), établissent qu'une autolyse des levures contenues dans les lies, tend à restituer au vin 75 p. 100 des acides aminés

qui avaient été enlevés au moût au cours de la fermentation, cette autolyse se produisant lors de la garde des vins sur lies.

Il nous a alors paru intéressant de reprendre cette étude dans le cas de la thiamine : la thiamine disparaît presque totalement pendant la fermentation, peut-elle être restituée au vin, et dans quelles proportions, par autolyse des levures au cours d'un séjour au contact des lies, comme cela se produit pour certains acides aminés?

Aucune source de vitamine B_1 ne doit être négligée, car chez l'Homme cette vitamine n'étant pas élaborée en quantité suffisante par les microorganismes du tube digestif, un apport alimentaire quotidien est nécessaire étant donné le rôle biologique très étendu qu'elle peut jouer. En effet, elle constitue sous forme d'ester pyrophosphorique un co-enzyme très important pour le métabolisme. En outre, elle permet de réduire la consommation d'alcool (MARDONES et ONFRAY, 1942; DELORE et BERRY, 1955). BEERSTECHER et *al.* (1951) ont constaté qu'une diminution de l'ingestion de thiamine, riboflavine, acide pantothénique, pyridoxine, pousse certains rats à boire de grosses quantités d'une solution alcoolique à 10 p. 100, alors que l'administration de la vitamine manquante réduit à nouveau cette consommation. D'autre part, elle contribue à améliorer les troubles consécutifs à l'absorption d'alcool (JAULMES, BOUCARD et LAVAL, 1959).

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

L'étude a été réalisée à partir de 6 cépages, *Aramon, Carignan, Alicante Bouschet, Hybride blanc 12.375, Cinsault, Clairette blanche* et *rouge*, provenant du Domaine expérimental de l'I. N. R. A. (Pech-Rouge), situé en bord de mer. Les raisins étaient cueillis à l'état de pleine maturité. Trois cas ont été envisagés :

1. Fermentation du jus de goutte seul.
2. Fermentation du jus de goutte ensemencé à raison de 10 millions de germes par ml au moyen de *Saccharomyces cerevisiae* (variété *ellipsoïdeus*), isolées à partir d'un moût de raisin en pleine fermentation.
3. Fermentation du raisin égrappé et foulé.

Les fermentations s'effectuaient dans des bonbonnes en verre de 20 litres à la température de 26°C, en l'absence totale d'anhydride sulfureux. La thiamine était dosée tous les jours pendant le début de la fermentation sur le liquide centrifugé. Une dizaine de jours après la fin de la fermentation un échantillon de la partie claire des vins était prélevé, soit T, et les lies étaient remises en suspension. Dans le cas de la fermentation du raisin foulé, on prélevait l'échantillon T, puis on procédait au pressurage. Les produits fermentés étaient alors conservés à la température de 20°. Après trois mois de repos, la détermination de la thiamine était effectuée sur le vin témoin T, ainsi que sur les liquides clairs surnageant les bourbes, soit A_1. Après prélèvement d'un échantillon de A_1, les bourbes étaient à nouveau agitées et le vin abandonné au repos. Ces deux opérations, prélèvement de vin clair et agitation des lies, furent répétées deux autres fois à un mois d'intervalle chacune.

On a ainsi obtenu pour chaque essai les vins suivants :

T : Vin témoin prélevé quelques jours après la fin de la fermentation.

A_1, A_2 et A_3 : Vins ayant respectivement subi une, deux et trois remises des lies en suspension.

Après la troisième agitation, la teneur en thiamine des lies a été évaluée. La vitamine B_1 était dosée par fluorométrie d'après OURNAC et FLANZY (1957). On a vérifié que dans les jus et les vins finis la vitamine B_1 se trouve sous forme libre et non sous forme d'ester pyrophosphorique, aussi l'emploi d'une phosphatase en vue d'hydrolyser l'ester au cours du dosage a été inutile. Le traitement à la phosphatase (Mylase P) a été effectué uniquement sur les jus en fermentation. Pour les bourbes, une hydrolyse acide ainsi qu'une hydrolyse enzymatique ont été pratiquées.

RÉSULTATS

Les résultats sont réunis dans les tableaux 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7.

Voici ce que l'on constate :

1. *Pendant la fermentation alcoolique* (tabl. 1 et 2).

Une chute de la teneur en thiamine se produit dès le démarrage de la fermentation, c'est-à-dire, dès la multiplication intensive des levures. Ce phénomène s'aperçoit nettement avec les jus ensemencés, pour eux la fermentation tumultueuse débute très tôt : l'ensemencement ayant lieu à 18 heures, le jus se trouve en pleine activité fermentaire dès le lendemain matin, on constate alors une disparition presque totale de la thiamine dans la plupart des cas.

Les jus de goutte naturels, qui ont un départ en fermentation retardé par rapport aux jus ensemencés, présentent parallèlement un retard dans la perte de thiamine. Les raisins foulés perdent moins rapidement la vitamine B_1 que le jus seul.

De toutes façons, dès la fin de la fermentation, tous les vins ne renferment pratiquement plus de vitamine B_1.

2. *Après la fin de la fermentation* (tabl. 1 et 2).

Les vins sont restés au repos sur les lies une dizaine de jours après la fin de la fermentation, on assiste pendant cette période à une augmentation de leur teneur en vitamine B_1. La quantité de thiamine rejetée par les levures dans le milieu, dès leur activité fermentaire terminée, est variable, elle varie de 10 à 100 γ par litre, elle est plus importante pour les vins issus de jus ensemencés.

3. *Après remise des lies en suspension dans le vin* (tabl. 3 et 4).

Dès la première agitation des lies, suivie d'un repos de 3 mois environ, on constate un notable enrichissement du vin en thiamine différent selon le cas : jus, jus ensemencé ou raisin foulé.

La deuxième ainsi que la troisième agitation des lies ne provoquent pratiquement plus d'apport de thiamine au vin dans la plupart des essais, dans certains on note une légère augmentation variant de 10 à 15 p. 100 (cas des *Clairettes blanches* et *rouges*).

A la suite de cet enrichissement, les vins de goutte se trouvent au moins aussi riches que le jus initial et dans la majorité des cas, plus riches de 10 à 60 p. 100, avec une moyenne de 20 p. 100. De plus, les vins issus de jus ensemencés ont tous des teneurs bien supérieures à celle des jus de départ. L'augmentation varie ici de 10 à 70 p. 100 avec une moyenne de 50 p. 100. La thiamine a été dosée dans les levures utilisées pour l'ensemencement. La thiamine apportée par ces levures s'élève à 21 γ par litre de jus ensemencé, quantité bien inférieure à l'augmentation constatée dans les vins. Les vins de macération ont subi, eux aussi, un enrichissement important mais plus variable, alors que le vin d'*Aramon* contient 35 p. 100 de thiamine de plus que le jus témoin, les vins de *Carignan* et d'*Alicante* se trouvent légèrement plus pauvres que les jus correspondants.

TABLEAU 1

Thiamine pendant la fermentation en γ par litre
(1re série d'essais)

Date des prélèvements	*Aramon*			*Carignan*			*Alicante-Bouschet*		
	Jus de goutte	Jus de goutte ensemencé	Raisins foulés	Jus de goutte	Jus de goutte ensemencé	Raisins foulés	Jus de goutte	Jus de goutte ensemencé	Raisins foulés
7 septembre (jus initial) ..	161	161	171	295	295	326	310	310	330
8 septembre		17			55			60	
9 septembre	12	4	80	17	8	235	87	4	238
10 septembre			4			175			187
13 septembre			4			7			7
22 septembre (vin T)	7,5	56	101	20	56	61	46	48	5

TABLEAU 2

Thiamine pendant la fermentation en γ par litre
(2e série d'essais)

Date des prélèvements	*Hybride blanc*		*Cinsault*		*Clairette blanche*		*Clairette rouge*	
	Jus de goutte	Jus de goutte ensemencé	Jus de goutte	Jus de goutte ensemencé	Jus de goutte	Jus de goutte ensemencé	Jus de goutte	Jus de goutte ensemencé
20 septembre (jus initial)	355	355	242	242	286	286	262	262
21 septembre	258	23	174	17	285	0	260	11
22 septembre	0	0	8	0	76	0	50	0

TABLEAU 3

Thiamine dans les vins, après remise des lies en suspension, en γ par litre
(1re série d'essais)

T = Vin prélevé le 22 sept. A_1 = Vin agité le 22 sept.
A_2 = Vin agité le 22 sept. et le 20 déc. A_3 = Vin agité le 22 sept., le 20 déc. et le 20 janv.

Nature des vins	Date des dosages										
	7 sept.	22 sept.	20 décembre		20 janvier			20 février			
	Jus initial	Vin T	T	A_1	T	A_1	A_2	T	A_1	A_2	A_3
Aramon											
Vin de goutte	161	7,5	7	165	6,5	180	180	8	164	168	168
Vin de goutte ensemencé.	161	56	58	250	58	260	261	56	258	258	263
Vin de macération	171	101	109	214	110	225	234	110	220	237	232
Carignan											
Vin de goutte	295	20	20	290	20	300	320	21	300	323	323
Vin de goutte ensemencé.	295	56	60	413	58	423	423	60	418	415	418
Vin de macération	326	61	60	245	63	250	285	61	241	250	260
Alicante Bouschet											
Vin de goutte	310	46	45	220	49	230	238	44	223	223	223
Vin de goutte ensemencé.	310	48	56	336	56	340	371	61	330	342	340
Vin de macération	330	5	8	230	9	240	269	8	223	245	271

TABLEAU 4

Thiamine dans les vins, après remise des lies en suspension, en γ par litre
(2e série d'essais)

T = Vin prélevé le 4 octobre
A_1 = Vin agité le 4 ocotbre
A_2 = Vin agité le 4 oct. et le 28 déc.
A_3 = Vin agité le 4 oct., le 28 déc. et le 28 janv.

Nature des vins	Date des dosages										
	20 sept.	4 oct.	28 décembre		28 janvier			28 février			
	Jus initial	Vin T	T	A_1	T	A_1	A_2	T	A_1	A_2	A_3
Hybride blanc											
Vin de goutte	355	16	15	436	16	427	440	13	430	460	460
Vin de goutte ensemencé.	355	109	109	507	115	487	516	115	490	487	512
Cinsault											
Vin de goutte	242	77	80	369	85	371	397	80	368	410	385
Vin de goutte ensemencé.	242	142	140	404	150	395	404	150	394	394	402
Clairette blanche											
Vin de goutte	286	30	35	16	36	20	26	34	13	16	21
Vin de goutte ensemencé.	286	4	5	220	3	229	258	6	216	250	280
Clairette rouge											
Vin de goutte	262	37	40	45	40	50	65	39	40	50	80
Vin de goutte ensemencé.	262	0	0	300	0	295	325	0	263	300	340

4. *Examen des lies* (tabl. 5).

Après la troisième agitation on a évalué la teneur des lies en vitamine B_1. Cette teneur, calculée par litre de vin, est faible par rapport à celle du vin lui-même (sauf dans le cas des *Clairettes* qui sera examiné à part). Les lies semblent être pratiquement épuisées en vitamine et ne plus pouvoir participer à un enrichissement.

La richesse en thiamine des levures qu'elles renferment ne peut certainement pas descendre au-dessous du taux qu'elles ont atteint et qui doit constituer un taux limite.

Dans le cas d'ensemencement, la teneur en thiamine des lies est plus élevée, elle est proportionnelle au nombre de cellules de levures, les lies étant ici plus riches en levures.

On remarque aussi que plus le vin est riche en vitamine B_1, plus les lies en sont riches, il devient dans ce cas difficile à la thiamine de diffuser dans le miileu.

Cette thiamine qui apparaît dans les vins dès la fin de la fermentation, provient des levures qui la laissent diffuser dans le milieu. Cette diffusion commence dès le repos des vins sur leurs lies et est accélérée par le brassage de ces lies.

5. *Cas particulier* : Clairettes blanches et rouges (tabl. 6).

Jus naturels. Au cours de la fermentation, la disparition de la thiamine est totale mais sa diffusion ultérieure dans le vin après trois agitations des lies ne se produit pratiquement pas dans la *Clairette blanche* et se produit très faiblement dans la *Clairette rouge.* On s'aperçoit que la thiamine n'a pas été détruite, car on retrouve ultérieurement dans les lies la quantité que renfermait le jus, cependant aucune synthèse n'apparaît (tabl. 5). Une quatrième, puis une cinquième agitation ont été réalisées, au cours desquelles on constate une augmentation de la teneur du vin en thiamine, légère pour la *Clairette blanche* et importante pour la *Clairette rouge.* Le vin de *Clairette rouge* se trouve alors aussi riche que le jus initial et sa teneur est presque égale à la somme Vin + Lies après la 3e agitation, ce qui montre que la diffusion de la thiamine par la levure est totale et qu'il n'y a pas eu synthèse. Les deux dernières agitations n'ont produit dans les autres essais aucune variation de la teneur des vins en vitamine B_1.

Les levures naturelles présentes dans les jus de *Clairette* ne synthétisent pas la thiamine et laissent diffuser lentement celle qu'elles renferment et qu'elles ont empruntée au jus, sans aucune destruction.

Les levures indigènes de la *Clairette rouge* sont beaucoup moins rapides que celles rencontrées sur les cinq autres cépages étudiés et sont beaucoup plus rapides que celles de la *Clairette blanche.*

Pour les cinq autres cépages, la restitution de la thiamine a été complète en trois mois, pour la *Clairette rouge* elle en a demandé sept.

Jus ensemencés. Leur comportement est identique à celui des autres jus ensemencés, l'action des levures exogènes a prédominé, celles-ci ont envahi le milieu et ont empêché les levures indigènes de se multiplier normalement.

Les deux phénomènes : synthèse et diffusion de thiamine, qui apparaissent nette-

TABLEAU 5

Thiamine dans les lies après leur 3e agitation

	Nature des vins																
	Aramon			*Carignan*			*Alicante Bouschet*			*Hybride blanc*		*Cinsault*		*Clairette blanche*		*Clairette rouge*	
	goutte	goutte ensem.	macéré	goutte	goutte ensem.	macéré	goutte	goutte ensem.	macéré	goutte	goutte ensem.	goutte	goutte ensem.	goutte	goutte ensem.	goutte	goutte ensem.
Thiamine des jus en γ/l + thiamine de l'ensemencement	161	182	171	295	316	326	310	331	330	355	376	242	263	286	307	262	283
Thiamine des vins en γ/l	168	263	232	323	418	260	223	340	271	460	512	385	402	21	280	80	340
Poids frais des lies en g/l de vin	19,5	46,2	27	34,8	67,1	33	30,5	53,8	32	61,3	70,5	65,3	56,9	37,7	39,5	43,5	33,4
Thiamine en γ dans 100 g de lies	77	102,5	79,5	61,7	72	45,5	70,5	136	98,3	70,5	65,9	84,1	79,5	612	318	446,5	281
Thiamine des lies exprimée en γ/l de vin	15	47,4	21,5	21,5	48,1	15	21,5	73,1	31,5	43,1	46,5	55	53	231	125,7	194	94
Thiamine des lies + thiamine des vins en γ/l	183	310,4	253,5	344,5	466	275	244,5	413	302,5	503	558,5	440	455	252	405,7	274	434

ment sont dus aux levures exogènes. On note, cependant, une légère rétention de la Vitamine B_1 par les lies après les premières agitations et un faible enrichissement du vin au cours des dernières agitations, surtout pour la *Clairette blanche*, ces deux phénomènes sont dus à la présence d'un petit nombre de levures indigènes. Ici, les propriétés de ces levures indigènes de ne pas synthétiser la thiamine et de ne laisser diffuser que lentement celle qu'elles ont absorbée, se manifestent très peu, étant donné le faible nombre de ces levures.

TABLEAU 6

Thiamine en γ par litre après remise en suspension supplémentaire des lies
Clairettes blanches *et* rouges

Date du dosage	Jus	Vins après agitations			Vin + lie
	20 septembre	28 février	20 avril	3 mai	28 février
Clairette blanche goutte	286	21	55	62	252
Clairette blanche goutte ensemencée	286	280	300	306	405,7
Clairette rouge goutte	262	80	205	264	274
Clairette rouge goutte ensemencée	262	340	340	349	434

Dans les vins de *Clairette* issus de jus ensemencés, trois phénomènes se sont superposés vis-à-vis de la thiamine :

— diffusion lente et de faible amplitude par les quelques levures indigènes qui ont subsisté ;

— synthèse par les levures exogènes ;

— diffusion par les levures exogènes.

Ce cas particulier nous a montré que les diverses souches de levures ont un comportement différent envers la synthèse et l'exsorption de la thiamine et nous a amené à orienter de nouvelles recherches dans cette voie.

6. *Conservation des vins* (tabl. 7).

En 1965 une série d'essais analogues avait été effectuée : vins de goutte et de macération ayant subi trois agitations successives des lies. Un an après on a dosé comparativement la thiamine dans les vins séparés des lies après la troisième agitation et dans les vins restés sur lies un an après cette troisième agitation.

On s'aperçoit alors que l'enrichissement en vitamine B_1 des vins restés sur lies ne s'est pas poursuivi, car les teneurs de ces vins sont sensiblement identiques à celles des vins décantés.

Par contre, la thiamine dont les vins se sont enrichis se conserve dans de très bonnes proportions que les vins soient ou non séparés des lies. On enregistre des pertes faibles variant de 0 à 14 p. 100 avec une moyenne de 7 p. 100.

TABLEAU 7

Thiamine dans les vins enrichis, après un an de conservation, en γ par litre

Date des dosages	Nature des vins															
	Vins de goutte								Vins de macération							
	décantés après la 3e agitation				conservés sur lies après la 3e agitation				décantés après la 3e agitation				conservés sur lies après la 3e agitation			
	Terret	*Aramon*	*Carignan*	*Mourastel*	*Terret*	*Aramon*	*Carignan*	*Mourastel*	*Terret*	*Aramon*	*Carignan*	*Mourastel*	*Terret*	*Aramon*	*Carignan*	*Mourastel*
Février 1965	190	180	196	195	190	180	196	195	170	244	266	242	170	244	266	242
Mars 1966	178	170	176	180	175	164	185	192	155	238	269,5	210	150	210	269	242
Pertes p. 100	6,3	5,5	10	7,6	7,8	8,8	5,6	1,5	8,8	2,5	0	14	11,7	13,9	11	0

DISCUSSION

La vitamine B_1 que renferment les levures dès la fin de la fermentation peut avoir une double origine :

a) *Elle provient du jus de raisin initial* : la levure la lui emprunte en totalité dès le début de la fermentation. En 1922, EIJKMAN et *al.* ont été les premiers à découvrir pour les levures de boulangerie et de brasserie, que la thiamine présente dans le milieu peut être absorbée par les cellules des microorganismes.

A partir de cette constatation, GORCICA et LÉVINE (1942), FINK (1944), STANDARD BRANDS Inc. (1949), ont établi un procédé industriel permettant de concentrer la thiamine de certains produits naturels et de préparer en même temps des levures enrichies. Si la perméabilité des cellules est perturbée, l'absorption de la thiamine diminue (FINK et JUST, 1941 *b*).

b) *Elle est élaborée par la levure* comme le montrent les cas où les vins se trouvent plus riches que les jus initiaux.

L'élaboration de la thiamine n'apparaît pas dans tous les cas de fermentation par les levures indigènes, soit que certaines soient incapables de la synthétiser, soit qu'elles n'aient pas eu besoin d'une dose supplémentaire, la thiamine présente dans le jus étant suffisante. Les levures utilisées pour l'ensemencement ont synthétisé dans tous les cas des quantités notables de thiamine. Il semble que certaines levures au cours de leur activité fermentaire ne trouvent pas toujours dans le jus une dose suffisante de vitamine B_1, auquel cas elles en élaborent des quantités variables selon leurs besoins. Ces besoins peuvent dépendre du nombre de levures au départ, de la capacité et de la rapidité de leur multiplication ainsi que des conditions de fermentation.

Les modalités de la biosynthèse de la vitamine B_1 par les microorganismes ne paraissent pas fixées d'une façon rigoureuse.

PAVCECK et *al.* (1937), indiquent que les levures sont capables de synthétiser la thiamine à partir des deux constituants, pyrimidique et thiazolique, de la molécule. Lorsque l'on fournit un seul des deux composés de la thiamine, en l'absence de l'autre, les levures varient dans leur capacité de compléter la synthèse. SCHULTZ et *al.* (1941) découvrent une levure capable de synthétiser la thiamine à partir de la pyrimidine tandis que VAN LANEN et *al.* (1942) ODINTSOVA (1943) FINK et JUST (1942) constatent la formation de thiamine à partir du thiazole et une synthèse négligeable à partir de la pyrimidine seule.

D'autre part SCHEUNERT et *al.* (1939) découvrent que les levures sont capables d'une synthèse totale de la thiamine à partir d'un milieu constitué d'hydrates de carbone et de sels nutritifs. Cependant sur des substrats exempts de thiamine certaines espèces de levures ont une capacité de synthèse plus grande que d'autres (LIVSHITS 1941). L'accroissement de la capacité de synthèse des levures peut résulter de sélection produite par des cultures successives en l'absence de thiamine (LEONIAN et LILLY, 1943).

Selon FINK et JUST (1941 *a*, 1942) LEWIS et *al.* (1944) ODINTSOVA (1941), il est clair qu'en anaérobiose la production de thiamine est plus importante qu'en

aérobiose. Une température d'incubation relativement basse et un pH voisin de 4,3 furent observés par PAVCEK et *al.* (1937-1938) comme augmentant la synthèse.

THIERS en 1956 répartit les levures en trois catégories : l'une incapable de toute synthèse et pour qui la molécule totale de thiamine doit être donnée, une autre capable de synthétiser la pyrimidine et une troisième capable de synthétiser le thiazole puis d'élaborer la molécule par union des deux noyaux.

Ces variations dans le comportement des levures envers la synthèse de la vitamine B_1, peuvent résulter de caractères génétiques différents comme cela se produit pour d'autres microorganismes.

Ainsi, d'après TATUM et BELL (1946) dans le cas de *Neurospora crassa* la mutation d'un seul gène a une grande influence sur l'élaboration de la thiamine. Alors que la souche-mère synthétise la thiamine par élaboration puis couplage des deux intermédiaires (dérivés thiazolique et pyrimidique) une des souches de mutant est incapable de fabriquer le dérivé thiazolique et accumule le dérivé pyrimidique, une autre synthétise les deux corps intermédiaires sans pouvoir les réunir et deux autres ont besoin qu'on leur fournisse les deux constituants de la thiamine qu'elles réunissent. D'autre part SCHERR et RAFELSON (1962) obtiennent des mutants d'*Escherichia coli* capables de synthétiser des quantités de vitamine B_1 bien supérieures à celles que synthétisent leurs parents.

Il apparaît que la capacité et les modalités de synthèse de la vitamine B_1 par les levures dépendent de la levure elle-même (caractères génétiques) et de facteurs externes, à la fois physiques (conditions d'aération, température) et chimiques (composition qualitative et quantitative du milieu). Il apparaît aussi que les différentes levures n'ont pas le même comportement vis-à-vis de la capacité et de la vitesse de diffusion de la thiamine qu'elles renferment.

Une étude des levures relative à leur pouvoir de synthèse et de diffusion de la thiamine serait peut-être intéressante à réaliser d'un point de vue œnologique.

CONCLUSION

Voici les conclusions pratiques qui découlent des résultats obtenus au cours de nos essais :

1. Les vins soutirés hâtivement, c'est-à-dire séparés très tôt de leurs lies, dès la fin de la fermentation tumultueuse comme cela se produit généralement dans la pratique ont des teneurs en thiamine très faibles, de l'ordre de 10 γ par litre.

2. Les vins que l'on laisse après la fin totale de la fermentation se clarifier une dizaine de jours au contact des lies voient leur teneur en thiamine augmenter sensiblement pour atteindre 50 à 100 γ par litre.

3. Les vins dans lesquels les lies ont été remises en suspension dès la fermentation terminée, ont, après clarification, une richesse en thiamine égale et généralement bien supérieure à celle des jus dont ils sont issus.

Étant donné l'importance du rôle biologique bénéfique que peut jouer la vitamine B_1, en particulier vis-à-vis de la consommation, et de l'utilisation de l'alcool, ainsi que des effets nocifs qu'il provoque, le vin ayant été le siège d'une remise ne

suspension des lies, devient, par sa teneur en cette vitamine, une boisson d'un intérêt physiologique non négligeable. La vitamine B_1 dont les vins se sont enrichis naturellement se trouve entièrement sous forme de thiamine libre, c'est-à-dire directemetn absorbable dans l'intestin, c'est la thiamine libre qui est la forme de circulation de la vitamine dans l'organisme humain. Dans ces conditions, un litre de vin peut fournir entre 1/10e et 1/4 des besoins journaliers de l'homme qui sont fixés autour de 2 mg.

Reçu pour publication en janvier 1967.

SUMMARY

THE INCREASE IN VITAMIN B_1 IN WINE STORED WITH ITS LEES

The authors studied the behaviour of vitamin B_1 during the fermentation of several grape juices and the storing of wines left with their lees.

The results led to four main findings :

1. Although thiamine from fresh grape juice disappears almost entirely when alcoholic fermentation begins, as it is used up by the yeast, it is not destroyed by this method.

2. The yeast is capable of elaborating within itself a certain quantity of thiamine in the course of alcoholic fermentation.

3. Almost all the thiamine contained in the yeast can diffuse into the wine after fermentation has ceased.

4. The different yeasts vary in their power of synthesis and rate of thiamine restoration.

Consequently, by putting the lees back into the suspension after fermentation, wines with a thiamine content at least equal to and often greater than that of the initial juices can be obtained. One litre of wine can thus provide between one tenth and one quarter of the daily needs of a man.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aschkenasy-Lelu Paule, 1960. L'alcoolisation chronique expérimentale. Influence exercée par divers facteurs physiologiques sur la consommation spontanée d'alcool chez les animaux de laboratoire. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **14**, 101-133.

Beerstecher E. jr, Reed J. G., Brown W. P., Berry L. J., 1951. D'après Aschkenasy-Lelu, 1960 (*op. cit.*). Univ. Texas Publ., N° 5109, 115-138.

De Bobadilla M. G. F., 1954. Rapport National VIIe Congrès International de la Vigne et du Vin. Rome, Sienne, septembre 1953. *Bull. Off. internation. Vigne*, **27**, n° 282, 16-18.

Cailleau R., Chevillard. L, 1949. Teneur de quelques vins français en aneurine, riboflavine, acide nicotinique et acide pantothénique. *Ann. agron.*, **19**, 277-281.

Delore P., Berry H., 1955. Carence alimentaire et recours à l'alcool. Recherches expérimentales. *La Presse médicale*, **63**, 1591-1592.

Eijkman C., Van Hoogenhuyze C. J., Derks T. J. G., 1922. The vitamine content of microorganisms in relation to the composition of the culture medium. *J. biol. Chem.*, **50**, 311-314.

Fink H., Just F., 1941 (*a*). Über den Vitamin B_1-Gehalt verschiedener Hefen und seine Beeinflussung. *Biochem. Z.*, **308**, 15-28.

Fink H., Just F., 1941 (*b*). Über den Vitamin B_1-Gehalt verschiedener Hefen und seine Beeinflussung. IV. Mitteilung : Die Abhängigkeit des Anreicherungseffektes von Dauer und Temperatur der Gärung sowie Zucker und Elektrolytkonzentration im Substrat. *Biochem. Z.*, **309**, 219-237.

Fink H., Just F., 1942. Über den Vitamin B_1-Gehalt verschiedener Hefen und seine Beeinflussung. VII. Mitteilung : Die Prüfung verschiedener Pyrimidinderivate auf deren Eignung als Vorstufen für die Biosynthese von Aneurin und Cocarboxylase. *Biochem. Z.*, **313**, 39-47.

Fink H., 1944. German Patent, 738655.

Flavier H., 1939. Évolution des vitamines B_1 et B_2 au cours de la maturation du raisin et de la fermentation alcoolique. *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 499-500.

GENEVOIS L., FLAVIER H., 1938-1939. Dosages des vitamines B_1 et B_2 dans quelques vins de la Gironde. *P. V. Soc. Sci. phys. nat.*, Bordeaux, 72-73.

GORCICA H. J., LEVINE H., 1942. U. S. Patent., 2295036.

HALL A. P., BRINNER L., AMÉRINE M. A., MORGAN A. F., 1956. The B vitamin content of grapes musts and wines. *Food Res.*, **21**, 362-371.

JAULMES P., BOUCARD M., LAVAL J. P., 1959. *Sur le Rôle protecteur de l'aneurine vis-à-vis de l'intoxication éthylique.* Société de Pharmacie de Montpellier (Séance du 15 juin).

VAN LANEN J. M., TANNER F. W., 1948. Vitamins in microorganisms. Distribution and quantitative synthesis. *Vitam. and Hormones*, **6**, 164-173.

LEONIAN L. H., LILLY V. G., 1943. Induced autotrophism in yeast. *J. Bacteriol.*, **45**, 329-339.

LEWIS J. C., STUBBS J. J., NOBLE W. M., 1944. Vitamin synthesis by *Torula* Yeast. *Arch. Biochem.*, **4**, 389-401.

LIVSHITS M. J., 1941. Biosynthesis of vitamin B_1 by yeast. *Proc. Sci. Instn. Vitam. Res. U. S. S. R.*, **3**, 184-188.

LODI M., 1943. Untersuchungen über den Gehalt von Carotin, Vitamin B_1, B_2 und C bei der alkoholischen garüng der Weinbeeren. *Vitam. Horm. Lpz.*, **4**, 443-455.

MARDONES R. J., ONFRAY B. E., 1942. D'après ASCHKENASY-LELU Paule, 1960 (*op. cit.*). *Rev. Chil. Hig. Med. Prev.*, **4**, 293-297.

MORGAN A. F., NOBLES H. L., WIENS A., MARSH G. L., WINKLER A. J., 1939. Food Research. The B vitamins of California grape juice and wines. *Food Res.*, **4**, 217-229.

ODINTSOVA E. N., 1941. Influence of vitamin B_1 on the fermentation capacity of microorganisms. *Microbiology*, **10**, 670-687.

ODINTSOVA E. N., 1943. Synthesis of vitamin B^1 by cultivated yeasts from thiazole. *C. R. Acad. Sci. U. R. S. S.*, **41**, 250-251.

OURNAC Mlle A., FLANZY M., 1957. Localisation et évolution de la vitamine B_1 dans le raisin au cours de la maturation. *Ann. Technol. agric.*, **6**, 257-292.

PAVCECK P. L., PETERSON W. H., ELVEHJEM C. A., 1937. Effect of growth conditions on yield and vitamin B_1 of yeast. *Industr. engng. Chem.*, **29**, 536-541.

PAVCECK P. L., PETERSON W. H., ELVEHJEN C. A., 1938. Factors affecting the vitamin B_1 content of yeast. *Industr. engng Chem.*, **30**, 802-805.

PERLMAN L., MORGAN A. F., 1945. Stability of B vitamins in grape juices and wines. *Food Res.*, **10**, 334-341.

PEYNAUD E., LAFOURCADE S., 1957. Sur les teneurs en thiamine des vins et des jus de raisin. *Industr. aliment. agric.*, **74**, 897-904.

SCHANDERL H., 1950. Die Mikrobiologie des Weines Eugen Ulmer Stuttgart. *Z. Ludwigsburg*, 47-49.

SCHERR C. H., RAFELSON (Jr) M. E., 1962. The directed isolation of mutants producing increased amounts of metabolites. *J. appl. Bacteriol.*, **25**, 187-194.

SCHEUNERT A., WAGNER K. H., FINK H., KREBS J., 1939. Die synthese von vitamin B_1 und B_2 (komplex) durch die Hefe *Torula utilis*. *Biochem. Z.*, **302**, 1-11.

SCHULTZ A. S., ATKIN L., FREY C. N., 1941. U. S. Patent 2262735.
Standard Brands Inc., 1949. U. S.Patent 2359521.

TATUM E. L., BELL T. T., 1946. *Neurospora*. III. Biosynthesis of Thiamin. *Amer. J. Bot.*, **33**, 15-20.

THIERS H., 1946. *Les vitamines, Biochimie, Biologie, Emploi thérapeutique.* Masson et Cie éd., p. 423.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (1), 55-68.

PREMIÈRES OBSERVATIONS SUR QUELQUES VARIÉTÉS DE PÊCHES DESTINÉES A LA CONSERVE

M. SOUTY, Annick PERRET, P. ANDRÉ

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est, 84 - Montfavet

SOMMAIRE

Devant le développement croissant des variétés de pêches Pavies, particulièrement adaptées aux traitements industriels pour la fabrication de fruits au sirop, les auteurs ont entrepris, en liaison avec leurs collègues chargés de la sélection variétale de ces fruits, l'étude chimique et le comportement technologique des variétés, étant, ou pouvant être intéressantes. Ils exposent les premiers résultats obtenus sur quelques-unes de ces variétés.

INTRODUCTION

La production annuelle des pêches s'accroît continuellement en France, le principal débouché restant le marché des fruits frais, mais les facilités que donnent les conserves ne peuvent laisser les consommateurs indifférents. Un tel marché est appelé à prendre de plus en plus d'ampleur du fait même de la vie moderne et de l'élévation du niveau social. On remarque en effet, de la part du consommateur, une demande croissante pour des produits élaborés tels que les fruits au sirop et des produits nouveaux, par exemple les pêches congelées au sirop. Pour de telles fabrications les fruits doivent posséder des qualités parfois différentes de celles demandées aux fruits frais. Les variétés traditionnellement cultivées et utilisées en France jusqu'à ce jour ne présentent pas toujours toutes les qualités technologiques désirées par l'industrie. Cependant il existe une catégorie de pêches possédant ces qualités, ce sont les Pavies dont l'expérimentation culturale en France est commencée depuis de nombreuses années (Souty, Bernhard et Huet, 1963), et dont les fruits sont

largement utilisés par l'industrie, notamment aux États-Unis, en Australie, en Italie et en Espagne. Les conserveries françaises ne disposent pas encore de beaucoup de ces fruits car les producteurs ont longtemps hésité à cultiver ces pêches à chair trop ferme pour être consommées à l'état frais et dont les exigences culturales posent certains problèmes.

Ils préfèrent les variétés à noyau libre, essentiellement américaines, dites « à deux fins », qui permettent la commercialisation en frais d'une partie de la récolte et la commercialisation des excédents pour la conserve. Si ce dernier point de vue est intéressant pour le producteur, il n'en est pas de même pour l'industriel.

Il existe un grand nombre de variétés de Pavies ; pour chacune d'elles le comportement peut être différent, en particulier suivant les régions de culture. Dans le *Catalogue des Espèces Fruitières* ces variétés sont classées dans la « Rubrique particulière », c'est-à-dire qu'elles font partie des variétés encore soumises à expérimentation avant leur inscription ou leur rejet définitif ; malgré cela, comme elles sont de plus en plus demandées par les conserveurs, de nombreux vergers importants commencent à se constituer.

Les caractères analytiques des principales variétés de pêches connues au moment de l'établissement de ce catalogue avaient été déterminés sur les fruits de la collection de la Station de Recherches d'Arboriculture fruitière de la Grande-Ferrade, près de Bordeaux, sur les récoltes des années 1946 à 1949. Les résultats analytiques sont rassemblés notamment dans les travaux de GENEVOIS et PEYNAUD (1947) et de PEYNAUD (1950).

Mais, depuis ces travaux, la sélection variétale a fait de grands progrès, et l'apparition des variétés nouvelles remet en question le classement qui avait été établi.

Il nous a donc semblé que le moment était venu de reprendre l'étude systématique, du point de vue chimique et technologique, de ces fruits produits en France.

Nous nous proposons de donner ici les premiers résultats de cette étude se rapportant à la composition chimique de quelques variétés.

ÉTUDES RÉALISÉES

A. — *Les Fruits*

Le matériel utilisé provient des vergers d'étude de divers domaines de la Station de Recherches d'Arboriculture fruitière de la Grande-Ferrade, et notamment du Domaine de Manduel (Gard) et de vergers voisins. Ce matériel a été obligeamment mis à notre disposition par nos collègues.

Les fruits ont été récoltés au stade de la maturité commerciale et analysés à des dates et dans les conditions rapportées dans le tableau 1.

La description morphologique de ces variétés se trouve dans les ouvrages de H. CAILLAVET et J. SOUTY (1950) et de J. HUGARD et R. SAUNIER (1965).

B. — *Analyses effectuées*

Après avoir pelé et dénoyauté les fruits, nous avons déterminé l'extrait réfractométrique au moyen d'un réfractomètre à main O.P.L. sur une partie de la pulpe, puis nous avons broyé le reste de la pulpe et avons effectué les analyses suivantes :

— l'extrait sec total à l'étuve à vide à 70°C ;

— le pH au moyen d'un pHmètre à électrode de verre ;

TABLEAU I

Caractères généraux, poids moyen, extrait sec et extrait réfractométrique des différents échantillons

Les résultats sont exprimés en g pour 100 g de matière fraîche.

Variétés	Dates		Observations	Poids moyen d'un fruit	Extrait sec	Extrait réfracto métrique
	Récolte	Analyse				
1. *Charles Ingouf* (a)	8—7	8—7	Pêche blanche non mûre	102	11,15	10,2
2. *Charles Ingouf* (b)	8—7	15—7	*Idem*, mûrie au labo.	104	12,65	11,4
3. *Dixired*	8—7	8—7	Pêche Jaune, mat. com.	133	10,94	10,1
4. *Redhaveu*	19—7	20—7	Pêche Jaune, mat. com.	130	13,23	11,7
5. *P. San Lorenzo*	23—7	26—7	Pavie Jaune, mat. com.	94	13,05	11,7
6. *P. Vesuvio*	28—7	29—7	Pavie Jaune, mat. com.	152	13,11	10,5
7. *P. Escarolita*	28—7	29—7	Pavie Jaune, mat. com.	88	13,45	10,8
8. *P. Stanford* (c)	4—9	7—9	Pavie Jaune, mat. com.	186	13,77	10,5
9. *P. Stanford* (d)	4—9	13—9	Pavie Jaune, conservée en chambre froide	179	15,95	14
10. *P. Corona*	16—9	20—9	Pavie Jaune, mat. com.	183	14,33	13,2
11. *Rubidoux*	16—9	20—9	Pêche Jaune, mat. com.	218	13,78	12,6
12. *P. Golden Queen*	21—9	22—9	Pavie Jaune, mat. com.	172	17,37	12,6

(*a*) = Fruits de maturité commerciale.
(*b*) = Fruits stockés 5 jours à 4°C puis mûris à la température ambiante.
(*c*) = Fruits de maturité commerciale.
(*d*) = Fruits stockés 9 jours à 4°C.

— l'acidité titrable par la quantité de soude 0,1 N nécessaire pour amener une partie aliquote de la pulpe à pH 8,1 ;

— les sucres par la méthode Bertrand, avant et après hydrolyse ;

— les matières pectiques par colorimétrie de la réaction se produisant entre l'acide galacturonique, l'acide sulfurique et le carbazol, réaction découverte par Dische et telle que l'a rapportée et utilisée Joux (1957). Nous avons déterminé les « pectines totales », c'est-à-dire les composés pectiques totaux obtenus par hydrolyse acide de la pulpe du fruit et les « pectines solubles », c'est-à-dire les composés pectiques solubles dans l'eau à la température ordinaire en utilisant la méthode d'extraction préconisée par Davignon (1960). Par différence nous obtenons les protopectines ou substances pectiques insolubles ;

— les acides organiques stables : qualitativement par chromatographie sur papier, quantitativement par fractionnement chromatographique sur gel de silice et sur résine Dowex 1, ce dosage s'effectuant après fixation, extraction et purification suivant la technique Roux et Lesaint (1959).

RÉSULTATS. DISCUSSION

A. — Remarques générales

Toutes les variétés, récoltées à maturité commerciale, ont été analysées à ce stade [1].

Nous y avons ajouté :

— l'analyse d'un échantillon de la variété *Charles Ingouf* qui avait subi une maturation de 36 h à la température ambiante après un stockage de 5 jours à 4°C ;

— l'analyse d'un échantillon de *Pavie Stanford*, après 9 jours de stockage à 4°C ; (ces fruits, lot n° 9, étaient alors légèrement ridés, symptôme d'un début de déshydratation).

B. — Résultats des analyses

1. *Résultats généraux*

Nous avons rassemblé dans les tableaux 1, 2, 3, 5, 6 et la figure, les résultats des analyses effectuées. Le tableau 4 contient différents rapports calculés à partir d'éléments des tableaux 1, 2 et 3.

Nous constatons pour les *Pavies Stanford* de l'échantillon n° 9, par rapport aux fruits de l'échantillon n° 8, un accroissement considérable de l'extrait réfractométrique et de l'extrait sec total, une augmentation sensible des sucres, particulièrement par rapport à la matière fraîche et surtout une nette augmentation des différents rapports du tableau 4. Ces accroissements sont dus à l'état de légère dessiccation de ces fruits.

De même pour l'échantillon n° 2, les pêches *Charles Ingouf* abandonnées 36 h à la température ambiante, nous voyons la modification excessivement rapide des résultats analytiques due à l'évolution de la maturité de ces fruits. L'analyse de ces deux lots met en relief, pour la technologie analytique, les difficultés que l'on peut rencontrer du fait des conditions dans lesquelles se trouvent les fruits entre le moment de la récolte et celui de l'analyse.

[1] Compte-tenu de l'impossibilité matérielle d'exécuter tous les dosages le jour même de la récolte, la maturation a été bloquée en chambre froide à 4°C et au maximum pendant 70 h, pour certains lots, comme il est indiqué dans le tableau 1.

2. *Dosages des sucres et de l'acidité*

a) *Dosages des sucres* (tabl. 2).

Les teneurs en sucres totaux et en saccharose sont extrêmement variables selon les variétés, néanmoins ces fruits sont riches en sucres. Par rapport à la matière sèche, toutes les variétés, sauf deux, *P. Corona* et *P. Vesuvio*, contiennent plus de 60 p. 100 de sucres totaux ; nous remarquons la richesse particulière de *Redhaven* (72 p. 100). Le saccharose est, dans toutes les variétés étudiées, le constituant glucidique le plus important (col. 5 du tabl. 2). La variété *P. Vesuvio* se révèle être la variété la moins sucrée des fruits que nous avons analysés cette année : elle ne renferme que 38 p. 100 de sucres totaux par rapport à la matière sèche et le saccharose ne représente que 64 p. 100 des constituants glucidiques.

TABLEAU 2

Teneurs en sucres des différents échantillons.

Résultats calculés pour 100 g de matière fraîche (chiffres droits) et 100 g de matière sèche (chiffres en italiques).

1	2	3	4	5	6
Variétés	Sucres totaux	Sucres réducteurs	Saccharose	Saccharose / Sucres réd.	P. 100 de saccharose des sucres totaux
1. *Charles Ingouf* (a) ...	7,7 — *69*	1,7 — *15*	5,7 — *51*	3,35	74
2. *Charles Ingouf* (b) ...	8,0 — *63*	2,0 — *16*	5,7 — *45*	2,85	71
3. *Dixired*	7,0 — *64*	1,3 — *12*	5,4 — *49*	4,15	77
4. *Redhaven*	9,5 — *72*	1,7 — *23*	7,4 — *56*	4,35	78
5. *P. San Lorenzo*	8,6 — *66*	1,0 — *8*	7,2 — *55*	7,2	83,5
6. *P. Vesuvio*	5,0 — *38*	1,6 — *12*	3,2 — *24*	2	64
7. *P. Escarolita*	8,8 — *65*	1,3 — *10*	7,1 — *53*	5,45	81
8. *P. Stanford* (c)	9,3 — *67*	1,4 — *10*	7,6 — *55*	5,4	81,5
9. *P. Stanford* (d)	11,3 — *71*	1,5 — *9*	9,3 — *56*	6,2	82
10. *P. Corona*	7,9 — *55*	1,5 — *10*	6,2 — *43*	4,15	78,5
11. *Rubidoux*	8,8 — *64*	1,8 — *13*	6,5 — *47*	3,6	74
12. *P. Golden Queen*	11,0 — *63*	1,4 — *8*	9,1 — *52*	6,5	83

b) *Acidité titrable et rapports Sucres/Acidité titrable.*

L'acidité titrable, ou libre, des fruits a été déterminée de la façon suivante : 5 g du broyat étaient placés dans un bécher avec 100 ml d'eau bidistillée de pH voisin de 7 ; on mesurait alors le pH de cette solution (col. 2, tabl. 3), et par addition de soude 0,1 N on l'amenait à pH 8,1, pH que l'on a considéré comme point final de la titration pour la détermination de l'acidité titrable. Nous avons exprimé cette acidité (tabl. 3) en milliéquivalents (méq.) et en grammes d'acide malique, pour 100 g de matière fraîche ou sèche selon les cas. Ce calcul nous permet de considérer

TABLEAU 3

pH et acidités des échantillons

— pour 100 g de matière fraîche (chiffres droits)
— pour 100 g de matière sèche (chiffres en italiques).

1	2	3		4	5	6	7
Variétés	pH	Acidité titrable en méq.	Acidité titrable en g d'acide malique	Anions totaux (en méq.)	Anions organiques (en méq.)	Ac. organique / Ac. totale (%)	Ac. titrable / Ac. totale (%)
1. *Charles Ingouf* (a)	3,30	14,1 — *126*	0,94 — *8,4*	14,8 — *133*	12,6 — *113*	85	95
2. *Charles Ingouf* (b)	3,55	11,0 — *87*	0,74 — *5,8*	11,3 — *89*	9 — *71*	80	97
3. *Dixired*	3,65	10,4 — *95*	0,70 — *6,3*	14,5 — *133*	12 — *110*	83	72
4. *Redhaven*	3,70	13,8 — *104*	0,92 — *7*	16,7 — *126*	13,6 — *103*	81	83
5. *P. San Lorenzo*	3,55	16,2 — *124*	1,09 — *8,3*	19 — *146*	15,5 — *119*	81	85
6. *P. Vesuvio*	4,00	12,6 — *96*	0,84 — *6,4*	13,5 — *103*	11,3 — *86*	83	93
7. *P. Escarolita*	4,20	12,4 — *92*	0,83 — *6,2*	12,8 — *95*	11,2 — *83*	87	97
8. *P. Stanford* (c)	3,90	9,1 — *66*	0,61 — *4,4*	14,3 — *104*	13 — *94*	91	64
9. *P. Stanford* (d)	3,95	8,8 — *55*	0,59 — *3,7*				
10. *P. Corona*	4,00	8,9 — *62*	0,60 — *4,1*	13 — *91*	11,4 — *80*	87	68
11. *Rubidoux*	3,75	12,3 — *89*	0,82 — *6*	15,4 — *112*	13,1 — *95*	85	80
12. *P. Golden Queen*	3,70	13,1 — *75*	0,88 — *5,9*	15,4 — *89*	13,4 — *77*	87	85

les rapports Sucres totaux/Acidité titrable (ST/AT) et Saccharose/Acidité titrable (Sa/AT) (tabl. 4). Ces rapports sont d'une grande importance pour la saveur. C'est ainsi que nous constatons que *P. Stanford* de l'échantillon n° 8 est beaucoup plus sucrée que toutes les autres (abstraction faite de l'échantillon n° 9 pour les raisons que nous avons indiquées précédemment). Par contre, *P. San Lorenzo* et surtout *P. Vesuvio* semblent moins sucrées que les autres variétés. Nous voyons l'intérêt du calcul de ces rapports si l'on considère par exemple *P. Corona* : cette pêche renferme en effet peu de sucres totaux et on serait tenté de la considérer comme peu sucrée, mais elle possède également une faible acidité, ce qui lui donne une « saveur sucrée » élevée.

TABLEAU 4

2. *ES/AT* = extrait sec total/acidité titrable.
3. *ER/AT* = extrait réfractométrique/acidité titrable.
4. *ST/AT* = sucres totaux/acidité titrable.
5. *Sa/AT* = saccharose/acidité titrable.

1	2	3	4	5
Variétés	ES/AT	ER/AT	ST/AT	Sa/AT
1. *Charles Ingouf* (a)....	11,9	10,8	8,2	6,1
2. *Charles Ingouf* (b) ...	17,1	15,4	10,8	7,7
3. *Dixired*.....	15,6	14,4	10	7,7
4. *Redhaven*	14,4	12,7	10,3	8
5. *P. San Lorenzo*	12	10,7	7,9	6,6
6. *P. Vesuvio*	15,6	12,4	5,9	3,8
7. *P. Escarolita*	16,2	11,7	10,6	8,5
8. *P. Stanford* (c)	22,6	17,2	15,2	12,5
9. *P. Stanford* (d)	27	23,7	19,1	15,8
10. *P. Corona*	23,9	22	13,2	10,3
11. *Rubidoux*	16,8	15,4	10,7	7,9
12. *P. Golden Queen*	19,7	14,3	12,5	10,3

En conclusion, nous ne pouvons pas dire que les Pavies se distinguent des Pêches par leur teneur en sucres ; les différences observées sont analogues aux différences variétales qui existent chez tous les végétaux (ULRICH, 1952).

c) *Acides organiques* (tabl. 3 et 5 et fig. 1).

Parallèlement à l'acidité libre, nous avons déterminé les anions totaux par titration potentiométrique de l'extrait de l'échantillon dessalifié par passage sur résine échangeuse de cations (Permutite 50 sous forme H^+). Nous avons ensuite effectué la séparation chromatographique des acides organiques sur des parties aliquotes de cet extrait. Cette séparation a été effectuée, d'une part sur gel de silice et d'autre part sur résine Dowex 1, résine échangeuse d'anions fortement basique ; l'utilisation simultanée de ces deux techniques permet d'obtenir une carte plus complète des acides organiques de l'échantillon. De plus elle confirme dans tous les cas les résultats obtenus lors de la séparation de certains acides. Les anions totaux ainsi déterminés, sont rapportés dans la colonne 4 du tableau 3. La colonne 5 de ce même tableau représente la somme des anions organiques stables (exprimés en

méq) que nous avons séparés lors de nos chromatographies. Nous voyons que la proportion des anions organiques par rapport aux anions totaux est d'une part assez constante et d'autre part toujours élevée puisqu'elle en représente de 80 à 91 p. 100. Par contre, l'acidité libre des fruits varie beaucoup plus selon les échantillons (col. 6 et 7 du tabl. 3). Il semble en résulter que les anions organiques, considérés globalement, ne puissent pas être un critère de sélection ; cependant, nous verrons l'importance de la proportion respective de certains acides organiques. Les fruits les moins acides à l'état frais, tels que *P. Stanford, Dixired* et *P. Corona* posséderaient donc davantage de cations minéraux pour neutraliser une partie de leur acidité.

Le tableau 5 fait apparaître que parmi les acides organiques nous avons caractérisé les acides :

quinique
shikimique } dosés ensemble (colonne 2)
glycérique
malique (colonne 3)
citrique (colonne 4)

ce qui représente, dans tous les cas, plus de 95 p. 100 des anions organiques (col. 6).

Le reste de ces anions est fourni par « d'autres acides organiques » (col. 5) et qui sont :

l'acide succinique
l'acide glycolique
l'acide malonique.

Dans nos analyses, l'acide malique représente (fig. 1) de 47 à 81 p. 100 des anions déterminés alors que l'acide citrique de son côté en représente de 8 à 42 p. 100.

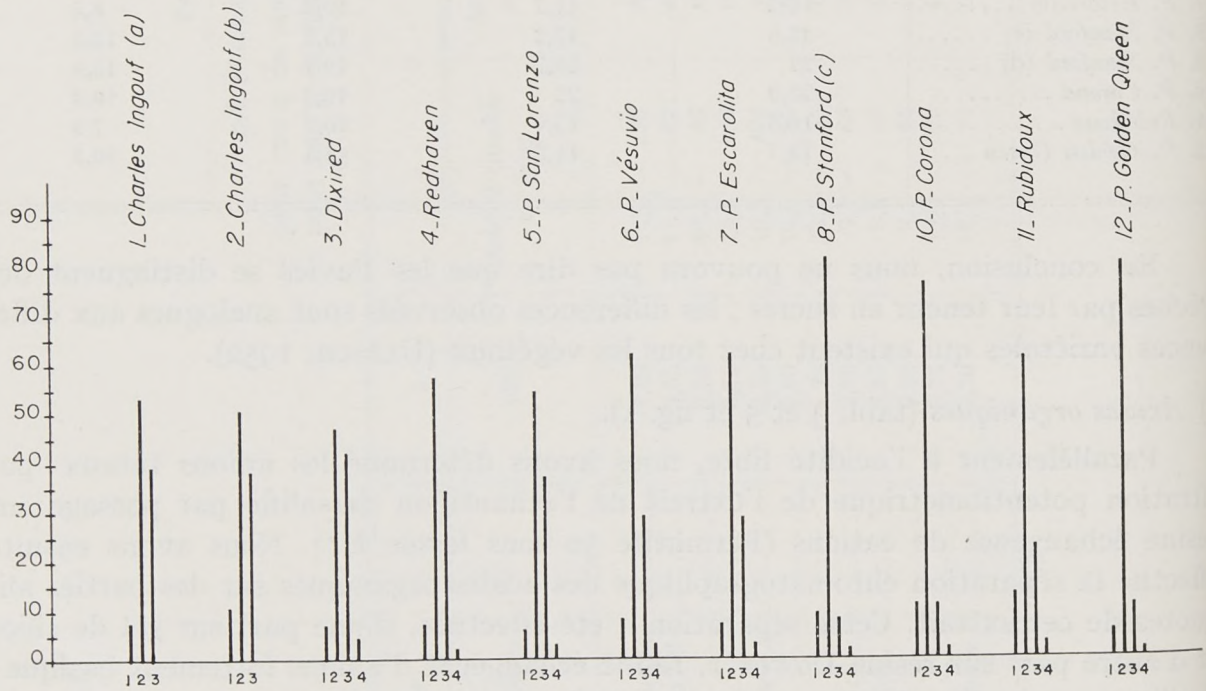


FIG. 1. — *Répartition des acides organiques dans les différents échantillons*
(résultats calculés en pourcentage par rapport aux anions organiques dosés)
Nous avons représenté, pour chaque variété, et successivement de gauche à droite :
1 : les acides quinique, shikimique et glycérique.
2 : l'acide malique.
3 : l'acide citrique.
4 : les « autres acides organiques ».

TABLEAU 5

Répartition des acides organiques dans les différents échantillons.

Résultats calculés en meq : pour 100 g de matière fraîche (chiffres droits)
pour 100 g de matière sèche (chiffres en italiques).

1	2	3	4	5	6	7
Variétés	Quinique Shikimique Glycérique	Malique	Citrique	Autres acides organiques	Total colonnes 2 + 3 + 4	Malique / Citrique
1. *Charles Ingouf* (a)	1,0 — *9*	6,7 — *60*	4,9 — *44*		12,6 — *113*	1,7
2. *Charles Ingouf* (b)	1,0 — *8*	4,6 — *36*	3,4 — *27*		9 — *71*	1,4
3. *Dixired*	0,9 — *8*	5,6 — *51*	5,0 — *46*	0,5 — *5*	11,5 — *105*	1,1
4. *Redhaven*	1,0 — *8*	7,7 — *58*	4,6 — *35*	0,3 — *2*	13,3 — *101*	1,7
5. *P. San Lorenzo*	0,9 — *7*	8,4 — *64*	5,7 — *44*	0,4 — *3*	15 — *115*	1,5
6. *P. Vesuvio*	0,9 — *7*	7 — *53*	3,0 — *23*	0,3 — *3*	10,9 — *83*	2,3
7. *P. Escarolita*	0,8 — *6*	6,9 — *51*	3,2 — *24*	0,3 — *2*	10,9 — *81*	2,2
8. *P. Stanford* (c)	1,2 — *9*	10,5 — *76*	1,1 — *8*	0,2 — *1*	12,8 — *93*	9,6
9. *P. Stanford* (d)						
10. *P. Corona*	1,2 — *8*	8,6 — *60*	1,3 — *9*	0,2 — *2*	11,1 — *77*	6,6
11. *Rubidoux*	1,7 — *12*	8 — *58*	3,0 — *22*	0,3 — *3*	12,7 — *92*	2,7
12. *P. Golden Queen*	0,8 — *5*	10,8 — *62*	1,5 — *9*	0,3 — *2*	13,1 — *76*	7,2

Il a semblé intéressant de calculer pour les différents échantillons les rapports acide malique/acide citrique. Ils sont rapportés dans la colonne 7 du tableau 5. Nous voyons alors apparaître deux grands groupes : celui des fruits relativement riches en acide citrique, pour lesquels les rapports ci-dessus sont inférieurs à 3, et celu des fruits extrêmement riches en acide malique pour lesquels les rapports sont supérieurs à 6. Ces résultats sont en bon accord avec ceux des auteurs ayant étudié les acides organiques des pêches. C'est ainsi que PEYNAUD (1950), ANET et REYNOLDS (1955), DAVID, LUH et MARSH (1956) Kay RYUGO (1964) ont trouvé que l'acide malique était l'acide organique prédominant, ce dernier auteur ayant déterminé des rapports acide malique/acide citrique variant de 3,7 à 53,2. Cependant, PEYNAUD avait signalé que l'acide citrique pouvait être prédominant dans certaines variétés, même à pleine maturité ; nous avons fait la même observation lors de l'analyse des fruits d'une conserve commerciale sans indication variétale.

TABLEAU 6

Matières pectiques des différents échantillons

Résultats exprimés en p. 100 de pulpe comestible fraîche (chiffres droits) et de matière sèche (chiffres en italiques).

1	2	3	4	5
Variétés	Pectines totales	Pectines solubles	Protopectines	P.100 de protopectines par rapport aux pectines totales
1. *Charles Ingouf* (a)....	0,75 — *6,7*	0,02 — *0,13*	0,73 — *6,5*	97
2. *Charles Ingouf* (b) ...	0,68 — *5,4*	0,53 — *4,2*	0,15 — *1,2*	22
3. *Dixired*.....	0,83 — *7,6*	0,35 — *3,2*	0,48 — *4,4*	58
4. *Redhaven*	0,78 — *5,9*	0,46 — *3,5*	0,32 — *2,4*	41
5. *P. San Lorenzo*	0,58 — *4,4*	0,10 — *0,76*	0,48 — *3,7*	84
6. *P. Vesuvio*	0,44 — *3,4*	0,12 — *0,93*	0,32 — *2,5*	74
7. *P. Escarolita*	0,51 — *3,8*	0,12 — *0,92*	0,39 — *2,9*	76
8. *P. Stanford* (c)				
9. *P. Stanford* (d)	0,90 — *5,6*	0,21 — *1,3*	0,69 — *4,3*	77
10. *P. Corona*	0,81 — *5,6*	0,35 — *2,4*	0,46 — *3,2*	57
11. *Rubidoux*	0,82 — *5,9*	0,63 — *4,6*	0,19 — *1,4*	24
12. *P. Golden Queen*	0,61 — *3,5*	0,15 — *0,9*	0,46 — *2,6*	74

Nous remarquons que les trois variétés les plus riches en acide malique sont également celles qui présentent les rapports ES/AT les plus forts. Ce qui prouve que la constitution des différentes variétés de pêches en ces deux acides a une répercussion importante sur leur caractère acide. Nous retrouvons là cette loi que les fruits à acide citrique sont des fruits acides alors que les fruits à acide malique le sont beaucoup moins. L'acide malique en effet diminue par combustion au cours de la maturation tandis que l'acide citrique est plus stable.

Nous remarquons également que les variétés de Pavies riches en acide citrique :

San Lorenzo, Escarolita et *Vesuvio* sont d'origine européenne (Espagne pour les deux premières et Italie pour la dernière). Par contre, *Stanford* et *Corona* sont d'origine californienne et *Golden Queen* nous vient de Nouvelle-Zélande.

3. *Dosage des matières pectiques*

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 6. Ils laissent apparaître, là encore, des variations importantes selon les variétés et montrent que les Pavies ne renferment pas systématiquement plus de pectines totales que les Pêches. Cependant, le pourcentage de protopectines par rapport aux pectines totales est toujours plus élevé chez les Pavies que chez les Pêches (col. 5). On remarque une différence très nette dans l'évolution des substances pectiques lors de la maturation ; la variété de pêches *Charles Ingouf* analysée après maturation ne renferme plus que 1,2 p. 100 de protopectines par rapport à la matière sèche (B. S.), soit 22 p. 100 (B. S.) des matières pectiques totales alors qu'à l'état non mûr cette même variété renfermait 6,5 p. 100 de protopectines (B. S.) soit 97 p. 100 (B. S.) des matières pectiques totales. Par contre, les *Pavies Stanford* analysées 10 jours après la cueillette renfermaient encore 77 p. 100 de protopectines par rapport aux matières pectiques totales (B. S.).

En outre, si nous faisons un classement en considérant le pourcentage des protopectines par rapport aux pectines totales (col. 5 du tabl. 6), nous avons dans l'ordre et en ne tenant pas compte des pêches *Charles Ingouf* non mûres.

P. San Lorenzo	84
P. Stanford	77
P. Escarolita	76
P. Vesuvio	74
P. Golden Queen.....	74
Dixired	58
P. Corona.....	57
Redhaven.....	41
Rubidoux	24

Parmi les qualités que doivent posséder les variétés utilisées pour la confection des fruits au sirop, la fermeté de la chair est une des plus importantes : en effet, seules les pêches à chair très ferme peuvent être travaillées mécaniquement et de plus les oreillons obtenus se conservent intacts et fermes après la pasteurisation et ne communiquent pas au sirop de particules de pulpe susceptibles de le troubler. Aussi, lors des dégustations des Pêches et des Pavies, la note de « tenue » attribuée en tenant compte de ces facteurs prend-elle une grande importance.

La plupart des variétés que nous venons de classer selon leur pourcentage de protopectines par rapport aux pectines totales ont été classées par CAILLAVET (1962) selon les notes de « tenue » obtenues au cours de dégustations, de la façon suivante :

P. San Lorenzo.....	9,09
P. Escarolita	8,54
P. Stanford	8,18
P. Corona	7,90
Dixired	7,19
Redhaven	7,12
Rubidoux	4,50

La similitude assez grande de l'ordre de ces deux classements, malgré les nombreux facteurs fluctuants (différence d'année, différence de région) nous permet de mieux préciser la corrélation existant entre ces deux facteurs : « tenue » et pourcentage en protopectines.

Nous pouvons dire :

— que les Pêches à noyau libre, considérées comme des fruits à chair non ferme et n'ayant pas une bonne « tenue » lors de leur utilisation en conserverie, sont des fruits dont la protopectine se dégrade très rapidement et presque complètement au cours de la maturation ou du stockage : les fruits deviennent fondants ;

— au contraire, les Pavies semblent conserver au cours de leur maturation une teneur élevée en protopectines, ce qui contribue à leur permettre de garder au cours des opérations de conservation, une texture appréciée par les industriels.

Ces phénomènes, et particulièrement celui du ramollissement de la chair au cours de la maturation, ont déjà fait l'objet de très nombreuses études pour la plupart des fruits. Au sujet des pêches, nous trouvons notamment les travaux de Appleman et Conrad (1926), Addoms, Nightingale et Blake (1930), Allen (1932), etc. Ces auteurs ont surtout étudié les transformations de la composition chimique des pêches au cours de la maturation et ont développé des tests de pression pour mesurer la fermeté de la chair. Mais le développement de variétés nouvelles de pêches et les changements intervenus dans les méthodes de conservation, de transport et de commercialisation après le dernier conflit mondial ont amené de nombreux chercheurs à se pencher à nouveau sur ce problème. Postlmayr, Luh et Leonard (1956) ont étudié les transformations pectiques durant la maturation des Pêches et des Pavies, l'effet que pouvait avoir l'état de maturité et les durées de fabrication sur ces substances pectiques lors de la mise en conserve des fruits. Ces études ont été reprises récemment par Shewfelt (1965). Tous ces auteurs ont associé la fermeté de la chair des pêches Pavies avec leur teneur élevée en protopectines et avec le fait que cette protopectine ne se solubilise pratiquement pas au cours de la maturation contrairement à ce qui se produit dans le cas des pêches à noyau libre.

Addoms et ses collaborateurs ont comparé l'évolution de la structure de la chair chez une Pêche classique puis chez une Pavie. Ils ont montré que l'évolution différente de la « tenue » était due au fait que chez la Pêche, on constate un arrondissement des cellules au moment de leur grossissement accompagné d'une diminution de l'épaisseur des parois cellulaires facilitant ainsi leur éclatement et la dispersion du contenu cellulaire, alors que chez la Pavie, au cours de la maturation, l'épaisseur des parois cellulaires diminue beaucoup moins, les cellules éclatent moins facilement, donc les espaces intercellulaires restent remplis de leur atmosphère gazeuse.

Nous savons que les protopectines constituent la plus grande partie des parois cellulaires, il est donc permis de penser qu'au début du développement des fruits, les Pêches et les Pavies possèdent des quantités voisines de protopectines mais que les systèmes enzymatiques qui président à leur dégradation ne sont pas semblables chez les deux fruits, ou que la nature de ces protopectines n'est pas identique, les protopectines des Pavies étant insolubilisées.

Les résultats de nos analyses s'accordant bien avec les travaux des auteurs déjà cités quant à la teneur élevée des pêche Pavies en protopectines, nous pensons qu'il y a là un facteur important à considérer lors de la sélection des variétés, et il

doit être possible de relier cette teneur en protopectines à des mesures de fermeté faites au moyen d'un pénétromètre adapté à ces fruits.

CONCLUSION

L'étude de la qualité des pêches au sirop ne peut être entreprise qu'en considérant successivement la qualité nutritionnelle (composition chimique), la qualité de consommation (caractères organoleptiques appréciés ou non par le consommateur) et la qualité technologique (aptitudes et facilités de traitement par l'industrie).

Les pêches Pavies présentent, par rapport aux pêches à noyau libre, une qualité technologique bien meilleure pour les fruits au sirop.

Nous avons abordé leur étude par celle de leur composition chimique :

— les teneurs en sucres et en acidité libre renseignent sur un des facteurs importants de la saveur : le goût sucré ;

— la composition en acides organiques, et notamment la proportion relative des acides malique et citrique joue un rôle sur la sapidité du produit ;

— la richesse en matières pectiques et, particulièrement en protopectines des pêches Pavies, est le facteur principal de la bonne « tenue » de ces fruits lors de leur transformation.

Les résultats de l'étude chimique des quelques variétés que nous avons commencé à étudier confirment la nécessité de relier les analyses faites sur les fruits frais à des observations sur les fruits en conserve ; il nous sera ainsi possible de fournir aux sélectionneurs des critères nouveaux et objectifs de choix.

C'est dans ce sens que nous allons nous efforcer de continuer ce travail lors des saisons prochaines.

Reçu pour publication en mai 1966.

SUMMARY

OBSERVATIONS ON SOME VARIETIES OF PEACHES USED FOR CANNING

The new varieties of peaches, and mainly the Clingstone peaches which varieties appeared several years ago, have completely modified the classification of these fruits. Clingstone peaches in particular are increasingly in demand by canners since they possess markedly improved technological qualities in comparison with the classical varieties. Their industrial use in France is relatively recent, but it is developing rapidly.

A chemical study has been carried out on the fruits of several varieties cultivated in the south-east of France, which were put at our disposal by colleagues at the *Station de Recherches d'Arboriculture fruitière de la Grande-Ferrade,* near Bordeaux.

The following were studied :

sugar and free acid content,
organic acids composition,
amount of pectinic matter, especially protopectins.

Among the organic acids, quinic, malic and citric acids always represented more than 95 p. 100 of the organic acidity, the rest of the acidity being due to shikimic, glyceric, succinic, glycolic, and malonic acids. The respective proportions of malic and citric acids varied considerably with the varieties.

The reputed high protopectin content of Clingstone peaches was verified. This seems to be closely linked with their good « behaviour ».

These preliminary results, which agree with those of other research workers, confirm the value of correlating analysis of fresh fruits with analysis of canned fruits in order to furnish breeders with new and objective criteria for selection.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADDOMS R. M., NIGHTINGALE G. T., BLAKE M. A., 1930. Development and ripening of peaches as correlated with physical characteristics, chemical composition and histological structure of the fruit flesh. II. Histology and microchemistry. *New Jersey agric. exper. Stn. Bull.*, n° 507, 3-16.

ALLEN F. W., 1932. Physical and chemical changes in the ripening of deciduous fruits. *Hilgardia*, **6**, 381-441.

ANET E. F. L. J., REYNOLDS T. M., 1955. Water-soluble constituents of fruits. IV. The organic acids in peaches. *Aust. J. Chem.*, **8**, 280-284.

APPLEMAN C. O., CONRAD C. M., 1926. Pectic constituents of peaches and their relation to softening of the fruit. *Maryland Univ. exper. Stn. Bull.*, n° 283-8 p.

CAILLAVET H., SOUTY J., 1950. *Monographie des principales variétés de pêchers.* Société Bordelaise d'Imprimerie, Bordeaux.

CAILLAVET H., 1962. Variétés de pêches pouvant convenir à la conserve. *Rev. Conserve*, mars-avril, 47-68.

DAVID J. J., LUH B. S., MARSH G. L., 1956. Organic acids in peaches. *Food. Res.*, **21** (2), 184-194.

DAVIGNON L., 1960. Comparaison de quelques méthodes de dosage des composés pectiques. *Fruits*, **15** (11), 469-472.

GENEVOIS L., PEYNAUD E., 1947. Comparaison de 16 variétés de pêches. *Rev. hortic.*, **30**, n° 2141, 295-298.

HUGARD J., SAUNIER R., 1965. *Monographie des principales variétés de pêchers.* Période d'étude : 1950-1962. I. N. R. A., Paris.

JOUX J. L., 1957. Sur quelques méthodes utilisées pour l'étude des matières pectiques et des enzymes pectolytiques des abricots et des conserves d'abricots. *Fruits*, **12** (11), 481-485.

PEYNAUD E., 1950. Sur la composition chimique des pêches. *Ann. agron.*, n° 6, 775-791.

POSTLMAYR H. L., LUH B. S., LEONARD S. J., 1956. Characterization of pectic changes in freestone and clingstone peaches during ripening and processing. *Food Technol.*, **10** (12), 618-625.

ROUX C., LESAINT C., 1959. Mise au point d'une technique de détermination des acides organiques chez les végétaux. *Ann. Physiol. vég.*, **1**, 83-91.

RUYGO K., 1964. Relationship between malic and citric acids and titratable acidity in selected peach and nectarine clones, *Prunus Persica*, BATSCH. *Proc. Amer. Soc. hortic. Sci.*, **85**, 154-160.

SHEWFELT A. L., 1965. Changes and variations in the pectic constitution of ripening peaches as related to product firmness. *Food. Sci.*, **30** (4), 573-576.

SOUTY J., BERNHARD R., HUET J., 1963. Possibilités culturales des variétés fruitières pour la conserve. *C. R. XIe Journées Fruitières d'Avignon*, 99-121.

ULRICH R., 1952. *La vie des fruits* Masson Éditeur, Paris.

CHRONIQUE DES LIVRES

MÉTHODES OBJECTIVES ET SUBJECTIVES D'APPRÉCIATION DES CARACTÈRES ORGANOLEPTIQUES DES DENRÉES ALIMENTAIRES. — *Journées scientifiques du Centre national de Coordination des Études et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation.* Paris, 23-27 novembre 1964, Paris, C. N. R. S., 1966, 606 p.

Les 19 communications recueillies dans ce volume sont les résultats d'un programme de recherches coordonnées et interdisciplines faites dans le domaine des problèmes nutritionnels par des psychophysiologistes, des physicochimistes, des chimistes, des statisticiens, des technologues des denrées, des médecins.

Longtemps l'appréciation des caractères organoleptiques des denrées fut empirique et guida le choix des aliments en dehors de toute considération relative à leur valeur nutritionnelle. Actuellement, cette appréciation commence à se poser en termes scientifiques et ces « journées » dirigées par M. le Pr TERROINE, Directeur du C. N. E. R. N. A., sont consacrées aux dernières recherches dans ce domaine.

Une première partie traite de problèmes généraux tandis que la seconde partie est consacrée à l'étude de l'appréciation des caractères organoleptiques de denrées bien déterminées : boissons, viandes, corps gras alimentaires, produits laitiers, céréales, fruits et légumes, etc.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire :* résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction*, dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires que pour le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet* placé en tête de l'article. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (DUPONT et DUVAL, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de : et *al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé selon la World List of Scientific Periodicals, ou le Bulletin Signalétique du C. N. R. S. ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.

Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5. *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est : 19 × 12,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront deux épreuves à corriger. Les corrections « d'auteur » ne sont autorisées que sur le premier jeu d'épreuves.

Envoi du manuscrit : M. FLANZY, Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude) France, ou M. MOCQUOT, Station centrale de Technologie des Produits animaux, Jouy-en-Josas. (Seine-et-Oise). Envoyer deux exemplaires.

TECHNOLOGIE AGRICOLE

Le Directeur-Gérant: M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 5-1967.

Dépôt légal : 2e trimestre 1967. N° d'impression: 224.

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 16 1967 NUMÉRO 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique,
à l'exception des sommaires et résumés.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (2), 75-79.

ÉTUDE DE L'INACTIVATION PAR LA CHALEUR DE LA POLYPHÉNOLOXYDASE DU JUS DE RAISIN

M. DEMEAUX et P. BIDAN

Station de Technologie végétale, 78 - Versailles
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Avec des techniques de chauffage du jus et de dosage de l'activité enzymatique mises au point dans un travail semblable sur le jus de pomme, les auteurs étudient l'inactivation thermique de l'activité polyphénoloxydasique du jus de raisin en liaison avec la pasteurisation.

L'influence de différents facteurs (temps et température de chauffage, pH du jus) est examinée.

INTRODUCTION

Dans le jus de raisin, comme dans la plupart des jus de fruits, on a pu mettre en évidence une activité polyphénoloxydasique. Celle-ci se traduit par un brunissement du jus dû à l'oxydation enzymatique de substances phénoliques. La pasteurisation du jus, utilisée pour la destruction de la flore microbienne, va agir également sur l'enzyme et prévenir ce brunissement. Mais l'efficacité de ce traitement va être conditionnée par la température et le temps de chauffage du jus.

Au cours d'une étude précédente (Demeaux, Bidan, 1966) nous avons étudié l'inactivation par la chaleur de la polyphénoloxydase du jus de pomme. Dans ce travail, nous donnons les résultats obtenus par les mêmes méthodes sur le jus de raisin.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nos essais ont été réalisés sur le jus de raisin de la variété *Rudelin 3*, récoltée dans le domaine de l'I. N. R. A. de Cours-sur-Loire et choisie pour son absence de pourriture en 1966, les moisissures augmentant l'oxydabilité du jus et pouvant interférer dans les dosages (Poux, 1966).

1° *Préparation du jus*

Comme dans les essais sur le jus de pomme, l'oxydation doit être évitée (température basse, brassage faible) car elle provoque une diminution de l'activité polyphénoloxydasique.

Le jus de presse obtenu avec un petit pressoir de laboratoire est recueilli et centrifugé pour éliminer les grosses particules en suspension. Cette centrifugation est indispensable pour avoir des résultats comparatifs, une grande partie de l'activité enzymatique restant liée aux débris solides.

Mais elle ne doit pas être trop poussée car elle risquerait d'éliminer toute activité. Nous avons utilisé le mode opératoire mis au point par POUX (1966), par centrifugation du jus à 1 500 *g* pendant 2 minutes.

2° *Chauffage du jus*

Nous avons repris la méthode mise au point pour le jus de pomme et utilisant deux procédés selon la durée. Pour des temps supérieurs à 1 minute, le chauffage est effectué dans des tubes en verre mince de faible diamètre, mais l'inertie thermique y est très importante (de l'ordre de 30 secondes). Pour des temps inférieurs à 1 minute, la précision est donc insuffisante et le chauffage est alors réalisé dans un appareil construit au laboratoire en s'inspirant de celui décrit par DIMICK, PONTING et MAKOWER (1951) et permettant une montée en température rapide (8 secondes).

3° *Mesure de l'activité de l'enzyme*

Comme dans notre travail précédent, l'activité résiduelle de la polyphénoloxydase est mesurée par la méthode colorimétrique de PONTING et JOSLYN (1948) adaptée pour nos essais. Nous mesurons la vitesse d'apparition de la coloration due à l'oxydation enzymatique du catéchol en une orthoquinone jaune brun. Cette méthode est simple, rapide et d'une précision suffisante pour nos essais.

RÉSULTATS

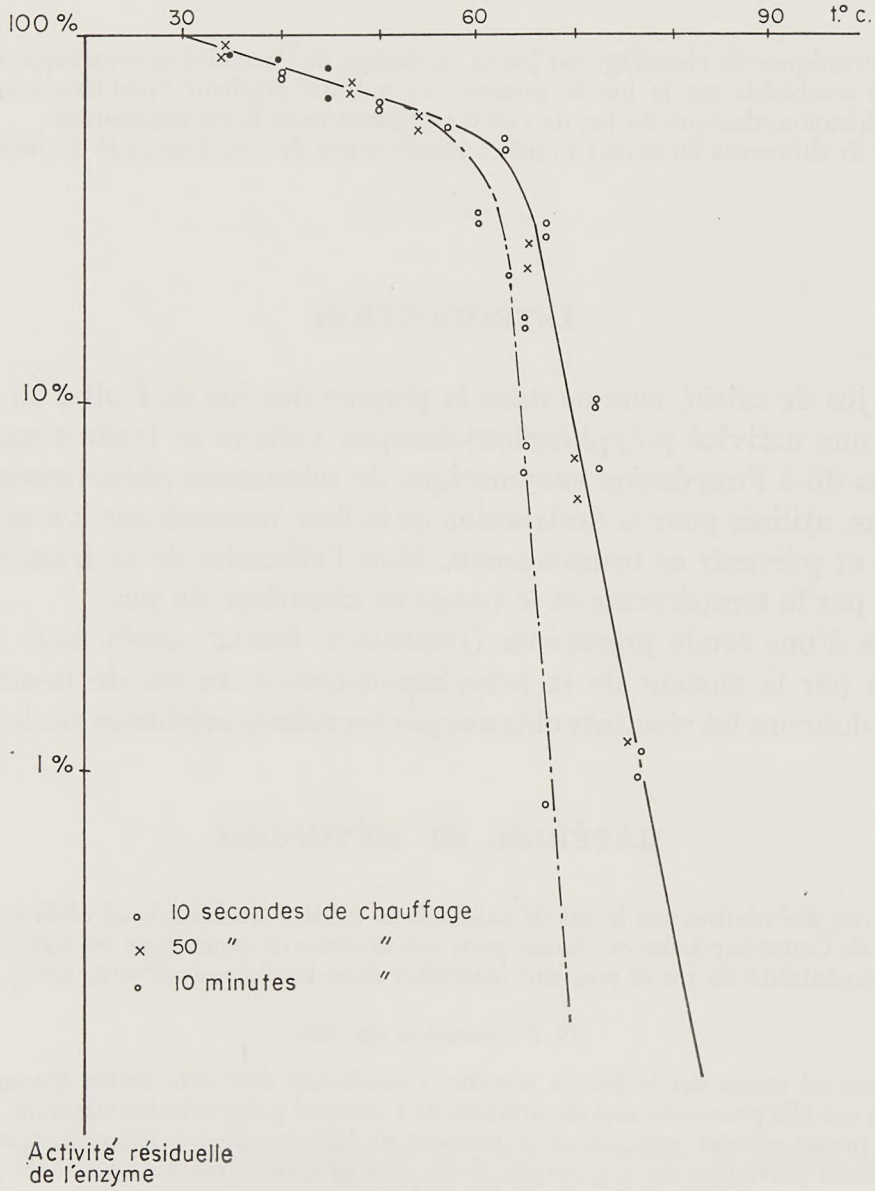


FIG. 1.

1° *Influence du temps et de la température de chauffage*

La figure 1 montre l'influence de la température de chauffage sur l'activité polyphénoloxydasique du jus de raisin. Nous constatons que ces courbes présentent un point de changement de pente qu'il est difficile d'expliquer. Mais ces résultats sont en accord avec ceux de DIMICK, PONTING et MAKOWER (1951) sur la purée de poire et les nôtres sur le jus de pomme.

La figure 2 montre l'influence du temps de chauffage en fonction de la température. Cette influence est faible en dessous de 60° puis elle augmente progressivement et devient très importante à 70°. La température limite où le temps de chauffage commence à prendre de l'importance se situe au point de changement de pente des courbes de la figure 1.

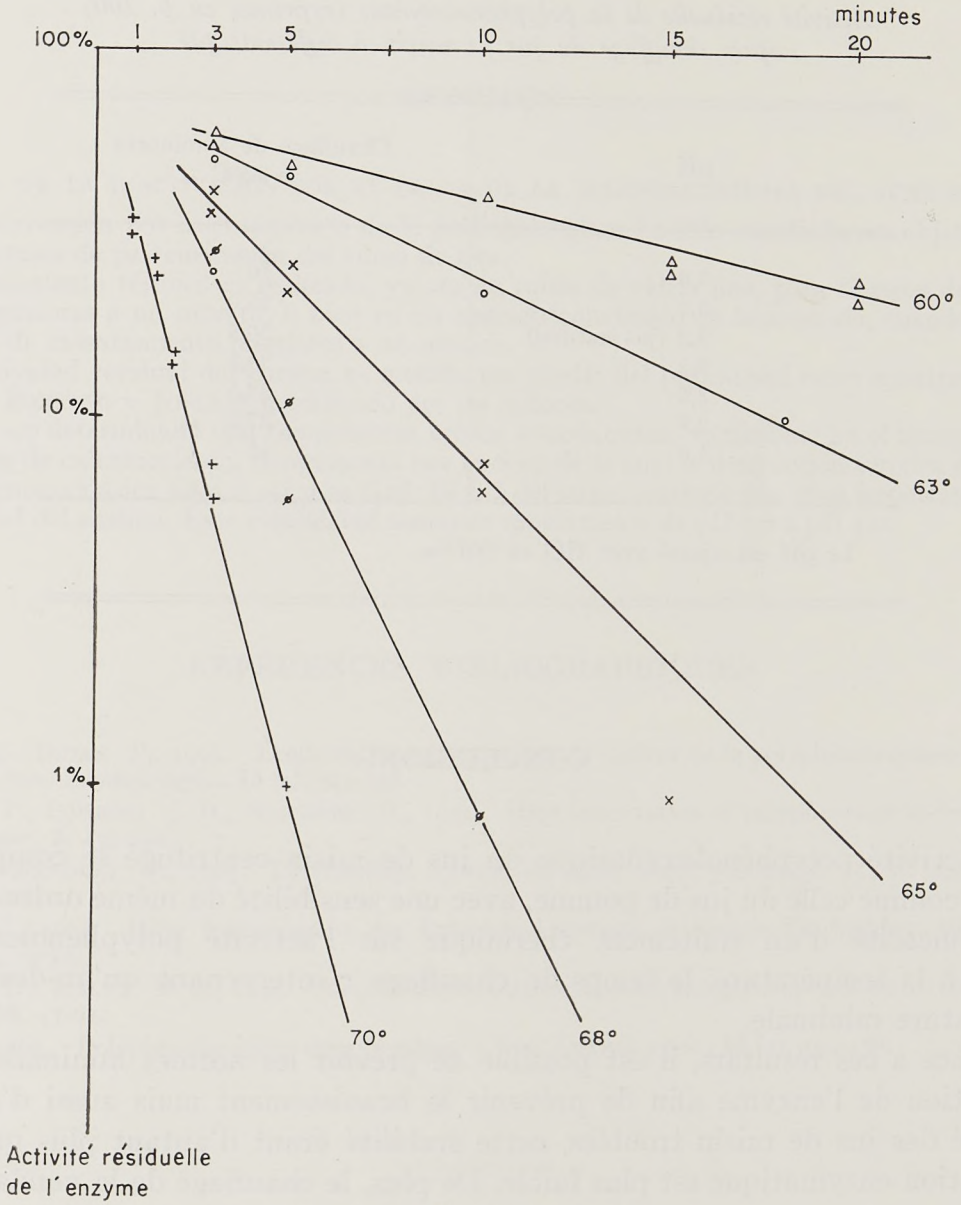


FIG. 2.

Cette température au-dessous de laquelle l'inactivation de l'enzyme est très difficile se situe vers 62°-65°C dans nos essais. Au-dessus de 80°C, il n'y a plus d'acti-

vité quel que soit le temps de chauffage. GUINOT et MENORET (1965) ont montré également que la polyphénoloxydase du jus de raisin est inactivée entièrement par un chauffage de 5 minutes à plus de 70°C.

2° *Influence du pH*

Des essais réalisés dans une zone de pH d'intérêt œnologique (pH 3,0 à 4,0) montrent que l'inactivation thermique de l'enzyme est d'autant plus facile que le pH est plus bas (tabl. 1). Ce fait a déjà été observé sur d'autres substrats par DIMICK, PONTING et MAKOWER (1951), JANKOV (1962), DEMEAUX et BIDAN (1966).

TABLEAU I

Activité résiduelle de la polyphénoloxydase (exprimée en p. 100) après chauffage du jus de raisin à différents pH

pH	Chauffage de 5 minutes à 65°C
3,0	19
3,2	25,6
3,3 (jus naturel)	26,5
3,4	28,5
3,6	32,5
3,8	37,5
4,0	41

Le pH est ajusté avec HCl et OHNa.

CONCLUSIONS

L'activité polyphénoloxydasique du jus de raisin centrifugé se comporte à la chaleur comme celle du jus de pomme, avec une sensibilité du même ordre.

L'efficacité d'un traitement thermique sur l'activité polyphénoloxydasique est liée à la température, le temps de chauffage n'intervenant qu'au-dessus d'une température minimale.

Grâce à ces résultats, il est possible de prévoir les normes minimales pour la destruction de l'enzyme afin de prévenir le brunissement mais aussi d'assurer la stabilité des jus de raisin troubles, cette stabilité étant d'autant plus grande que l'oxydation enzymatique est plus faible. De plus, le chauffage de la vendange devenant une pratique courante, il est possible d'envisager un contrôle de ce chauffage par le pourcentage d'inactivation de la polyphénoloxydase.

Reçu pour publication en mai 1967.

SUMMARY

STUDY OF THE INACTIVATION OF GRAPE JUICE POLYPHENOLOXIDASE BY HEAT

Thermal inactivation of polyphenoloxidase was studied for defining precisely the standards for grape juice pasteurisation .

The thermal treatment was carried out either in thin glass tubes (for heating times greater than 1 minute) or in a laboratory-built apparatus (for heating times less than 1 minute).

Residual enzyme activity was measured with pyrocatechol as a substrate by PONTING and JOSLYN's method, modified by the author.

By varying time and temperature, a critical temperature can be determined above which thermal destruction of polyphenoloxidase is more easy. pH of the juice is of great importance on the thermal enzyme stability ; this stability increases rapidly from pH 3,0 to pH 4,0.

RESUMEN

ESTUDIO DE LA INACTIVACION POR EL CALOR DE LA POLIFENOLOXIDASA DEL ZUMO DE UVA

La inactivación por calentamiento de la polifenoloxidasa ha sido estudiada con objeto de priecisar las normas de pasteurización del zumo de uva.

El tratamiento térmico es realizado, ya sea en tubos de vidrio fino, para tiempos de calentamiento superiores a un minuto, o bien en un aparato construido en laboratorio, cuando se trata de tiempos de calentamiento inferiores a un minuto.

La actividad residual dei enzima es medida por medio del pirocatecol como substrato, por el método de PONTING y JOSLYN, modificado por los autores.

Puede ser determinada una temperatura crítica introduciendo variaciones en el tiempo y en la temperatura de calentamiento, temperatura por encima de la cual la destrucción térmica de la actividad polifenoloxidásica llega a ser más fácil. El pH del zumo presenta una gran importancia sobre la estabilidad del enzima. Esta estabilidad aumenta rápidamente de pH 3,0 a pH 4,0.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DEMEAUX M., BIDAN P., 1966. Étude de l'inactivation par la chaleur de la polyphénoloxydase du jus de pomme. *Ann. Technol. agric.*, **15** (4), 349-358.

DIMICK K. P., PONTING J. D., MAKOWER B., 1951. Heat inactivation of polyphenolase in fruit purees. *Food Technol.*, **5**, 237-241.

GUINOT Y., MENORET Y., 1965. Le chauffage continu du raisin avant pressurage. *C. R. Acad. Agric.*, **51** (12), 866-872.

JANKOV S. I., 1962. Hitze Inaktivierung der Polyphenoloxydasen in einigen Fruchtsäften. *Fruchtsaft-Industr.*, **7**, 13-32.

PONTING J. D., JOSLYN M. A., 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extract. *Arch. Biochem.*, **19**, 47-63.

POUX Ch., 1966. Polyphénoloxydase dans le raisin. *Ann. Technol. agric.*, **15** (2), 149-158.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (2), 81-88.

L'OXYDATION BIOLOGIQUE DU MOÛT DE RAISIN

II. — ÉTUDE COMPARÉE DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX ET DE LA BENTONITE EN TANT QU'INACTIVATEURS DE LA POLYPHÉNOLOXYDASE DU MOUT DE RAISIN (1)

T. IVANOV

Institut technologique supérieur des Industries alimentaires, Plovdiv (Bulgarie)

SOMMAIRE

Au cours de son extraction, le moût entre en contact avec l'oxygène de l'air, d'où une série de processus oxydatifs, en particulier par la polyphénoloxydase. Pour obtenir des vins mousseux et des vins blancs de table de haute qualité, on doit prévenir ces processus.

L'étude des facteurs d'inhibition est fondamentale. On est peu renseigné sur les modalités d'inactivation de la polyphénoloxydase par l'anhydride sulfureux et la bentonite.

INTRODUCTION

Depuis bien longtemps, l'anhydride sulfureux est considéré en Œnologie comme un des meilleurs antiseptiques et antioxydants. Dans quelques-unes de nos publications antérieures (1954, 1959, 1963), nous avons mis en évidence l'effet positif de l'anhydride sulfureux sur la clarification du moût et la conservation de la couleur, de l'acidité, du bouquet et des qualités organoleptiques de certains vins blancs de Bulgarie.

Étudiant le mécanisme de stabilisation au moyen d'anhydride sulfureux de la vitamine C dans les choux et les pommes de terre, SISSAKIAN (1945) indique son effet inhibiteur sur l'activité de la peroxydase, la polyphénoloxydase et l'ascorbicoxydase. Il explique la stabilisation de la vitamine C par le blocage du groupe actif de ferments sous l'effet de l'acide sulfureux.

BAYER, BORN et REUTHER (1957), signalent que l'anhydride sulfureux diminue l'activité de la polyphénoloxydase dans le moût.

(1) La première partie de cet article a paru dans les *Ann. Technol. agric.*, 1967, **16** (1).

DEIBNER et RIFAÏ (1963 *b*) étudient simultanément l'action de l'acide carbonique, des hautes et basses températures et l'effet de l'anhydride sulfureux sur l'activité de la polyphénoloxydase dans des jus de raisin conservés par ce procédé.

En œnologie, l'usage de la bentonite pour clarifier et stabiliser les vins est postérieur à celui de l'anhydride sulfureux.

D'après MAYER-OBERPLAN (1956) ce n'est qu'en 1954 qu'on autorise officiellement en Allemagne la clarification du vin à la bentonite. Jusque-là on y employait le kaolin et la terre d'Espagne.

En peu d'années, dans presque tous les pays viticoles, on commença à recourir à la bentonite pour clarifier le vin et en stabiliser la limpidité. Cependant, on a des données très insuffisantes sur l'effet de la bentonite sur les ferments d'oxydation du moût et du vin. On peut admettre par analogie que la bentonite, précipitant les protéines du moût, précipiterait de même les ferments d'oxydation qui, on le sait, sont des protéines spécifiques. C'est pourquoi, NILOV (1961) traite à la bentonite au taux de 2-10 g/l du moût de divers cépages. Il établit que le moût traité n'absorbe pas d'oxygène, tandis que le moût non traité en absorbe. La quantité d'oxygène absorbé variant avec le cépage, l'auteur en conclut qu'au cours du traitement à la bentonite, les ferments d'oxydation sont précipités et séparés du moût.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Nos essais ont porté sur du moût des cépages bulgares *Muscat rouge*, et *Dimiat*. Nous avons déterminé l'activité de la polyphénoloxydase par la méthode à la purpurogalline de WILLSTATER et STOLL (1918), modifiée par KEILLIN et MANN (1938). Plus tard cette méthode modifiée fut décrite par BOTTCHER (1961), DEIBNER et RIFAI (1963 *a*) et d'autres auteurs. Nous avons effectué la détermination à l'aide du photomètre de Pulfrich (filtre de 42 et cuvette de 50 mm).

Pour identifier la présence de la polyphénoloxydase dans le moût d'essais, nous avons eu aussi recours à la réaction qualitative sensible, au moyen de *p*-phénylènediamine et de pyrocatéchine.

Nous avons complété l'analyse du moût par les déterminations suivantes : acidité de titration, pH et E_r (évalués à l'aide du potentiomètre) et quinones suivant la méthode de RODOPOULO (1954, 1962).

RÉSULTATS

Les essais ont été effectués en laboratoire. Nous avons observé la formation de quinones dans le moût non traité, provenant des cépages ci-dessus. Pour ce faire, nous avons prélevé des quantités égales de moût qui ont été mises dans un récipient de verre de 29 cm de longueur et 15 cm de largeur, la hauteur du moût étant de 2,5 cm. Nous déterminions la teneur du moût en quinones à des intervalles d'une heure. A chaque détermination nous brassions le moût et en réduisions la quantité de 50 ml.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau 1.

Ce tableau fait voir, qu'en comparaison avec le moût de cépage *Dimiat*, l'oxydation du moût du cépage *Muscat rouge* est bien plus énergique et accompagnée d'une grande accumulation de quinones.

Une heure après obtention du moût des deux cépages ci-dessus les quantités de quinones sont respectivement de 8,61 et 2,87 mg/l et 4 heures après de 19,47 et 8,40 mg/l. La quantité de quinones baisse 6 à 7 heures après l'obtention du moût du cépage *Muscat rouge* et 4 à 5 heures après l'obtention du moût du cépage *Dimiat*. Ce fait s'explique par la conversion des quinones en produits condensés, qu'on ne saurait déterminer suivant la méthode de RODOPOULO (1954, 1962).

TABLEAU I

Formation de quinones dans le moût provenant de cépages Muscat rouge *et* Dimiat

Temps (h)	*Muscat rouge* (mg/l)	*Dimiat* (mg/l)
Temps 0	1,27	0,00
Après 1	8,61	2,87
2	11,37	6,76
3	15,99	7,25
4	19,47	8,40
5	21,32	—
6	22,14	—
7	24,60	—
8	24,39	—
9	24,49	—
17	—	7,17
18	—	6,86
19	—	5,63
22	12,81	—

En même temps que s'opère l'accumulation de quinonés et de produits oxydés condensés, la couleur du moût passe du verdâtre au brun, semblable à celle qu'acquiert le moût, quand, traité industriellement, il subit une forte aération et séjourne longtemps au contact avec l'air dans des récipients découverts. Immédiatement après obtention du moût, nous avons prélevé des prises d'essais de 500 ml, que nous avons traitées avec diverses quantités d'anhydride sulfureux et de bentonite.

L'effet de l'anhydride sulfureux et de la bentonite en tant qu'inactivateurs de la polyphénoloxydase est mis en évidence dans le tableau 2.

Les données du tableau ci-dessous font voir que l'augmentation de la dose d'anhydride sulfureux fait baisser l'activité de la polyphénoloxydase. Il en est de même de la teneur en quinones. Dans la variante I à 0,5 g/hl d'anhydride sulfureux, la teneur en quinones est de 8,91 mg/l et dans la variante IV à 2,0 g/hl d'anhydride sulfureux, elle en est de 7,27 mg/l. Les autres variantes V à VII à 5, 15 et 25g/hl. d'anhydride sulfureux ne comportent pas de polyphénoloxydase active et de quinones. Pour identifier la présence de polyphénoloxydase active, nous avons eu recours aussi à la réaction qualitative spécifique et sensible à la *p*-phénylènediamine et pyrocatéchine. Ces données attestent qu'une dose de 5 g/hl d'anhydride sulfureux suffit à inactiver la polyphénoloxydase du moût.

Le même tableau fait encore voir que le potentiel d'oxydoréduction du moût de *Muscat rouge* baisse de 184 mV dans le témoin à 94 mV dans la variante VII à 25 g/hl d'anhydride sulfureux. Il en est de même du moût du cépage *Dimiat*.

TABLEAU 2

Effet de l'anhydride sulfureux et de la bentonite sur l'activité de la polyphénoloxydase et d'autres composants du moût

Variantes	Acidité de titration (g/l)	pH	Potentiel rédox en mV (1)	Activité (2) polyphénol-oxydasique	Quinones (mg/l)
Muscat rouge, 13 octobre 1964					
Prise d'essais sans anhy. sulf.	4,70	3,20	184	—	—
Var. I 0,5 g/hl anhyd. sulf..	4,70	3,15	216	5,6	8,91
Var. II 1 g/hl — .	4,70	3,15	216	5,0	8,30
Var. III 1,5 g/hl — .	4,70	3,15	168	4,7	7,07
Var. IV 2 g/hl — .	4,70	3,15	164	4,3	7,27
Var. V 5 g/hl — .	4,77	3,15	126	0,0	0,00
Var. VI 15 g/hl — .	4,84	3,05	104	0,0	0,00
Var. VII 25 g/hl — .	4,98	3,05	54	0,0	0,00
Muscat rouge, 16 octobre 1964					
Prise d'essais sans bentonite	4,77	3,20	213	—	—
Var. I 10 g/hl bentonite.....	4,77	3,20	210	6,2	5,33
Var. II 20 g/hl —	4,77	3,20	211	4,9	4,81
Var. III 40 g/hl —	4,77	3,20	208	—	4,51
Var. IV 60 g/hl —	4,64	3,25	207	2,6	4,51
Var. V 100 g/hl —	4,57	3,30	224	0,0	2,97
Var. VI 150 g/hl —	4,57	3,30	224	0,0	0,00
Var. VII 200 g/hl —	4,36	3,30	228	0,0	0,00
Dimiat, 6 octobre 1964					
Prise d'essais sans anhyd. sulf. ...	5,25	3,40	164	—	—
Var. I 0,5 g/hl — .	5,25	3,40	148	11,00	—
Var. II 1,0 g/hl — .	5,25 —	3,40	142	6,0	—
Var. III 1,5 g/hl — .	5,25	3,45	126	0,0	—
Var. IV 2,0 g/hl — .	5,52	3,30	135	0,0	—
Var. V 5,0 g/hl — .	5,73	3,30	105	0,0	—
Var. VI 15,0 g/hl — .	5,72	3,30	93	0,0	—
Var. VII 25,0 g/hl — .	5,66	3,30	85	0,0	—
Dimiat, 10 octobre 1964					
Prise d'essais sans bentonite	4,91	3,30	200	—	—
Var. I 10 g/hl bentonite.....	4,84	3,30	200	8,0	—
Var. II 20 g/hl —	4,77	3,30	200	4,0	—
Var. III 40 g/hl —	4,70	3,25	205	0,0	—
Var. IV 60 g/hl —	4,70	3,25	212	0,0	—
Var. V 100 g/hl —	4,70	3,30	188	0,0	—
Var. VI 150 g/hl —	4,70	3,40	188	0,0	—
Var. VII 200 g/hl —	4,60	3,40	198	0,0	—

(1) Mesuré par rapport à l'électrode à H.
(2) Mesurée en mg de purpurogalline pour 100 ml de moût.

Ce fait atteste que l'anhydride sulfureux agit simultanément comme inactivateur de la polyphénoloxydase et accepteur de l'oxygène du moût. C'est lui qui empêche l'oxydation du moût et détermine par là la qualité du vin futur. L'augmentation de la dose d'anhydride sulfureux entraîne l'augmentation de l'acidité titrable et réelle du moût. Ceci est évident surtout dans les variantes à dose élevée d'anhydride sulfureux.

Si l'on observe les modifications de la limpidité du moût, on constate qu'elle est bien meilleure dans les variantes à dose élevée d'anhydride sulfureux que dans le témoin. On fait les mêmes constatations quant à la couleur du moût. Les variantes V, VI et VII à dose élevée d'anhydride sulfureux conservent le mieux leur couleur verdâtre. Vingt-quatre heures après leur sulfitage, elles ne dénotent pas de réaction de polyphénoloxydase et ne comportent pas de quinones. Ceci atteste que le moût de ces variantes n'a subi aucun processus d'oxydation. C'est dans le témoin que la couleur passe le plus vite du verdâtre au brun.

Dans le cas d'essais effectués au moyen d'anhydride sulfureux, le volume du précipité varie de 30 à 50 ml, la limpidité du moût étant relativement bonne.

La bentonite inactive aussi la polyphénoloxydase. L'augmentation de la dose de bentonite diminue l'activité de la polyphénoloxydase et la quantité de quinones dans le moût. Ce fait est en rapport avec le cépage. Dans le cas d'essais portant sur le cépage *Muscat rouge*, on n'a pas relevé de polyphénoloxydase active et de quinones dans la variante VI à 150 g/hl de bentonite, tandis que, dans les essais portant sur le cépage *Dimiat*, la variante III déjà à 40 g/hl de bentonite n'a pas présenté de polyphénoloxydase active.

Le traitement à la bentonite à doses élevées, n'a presque pas d'effet sur le potentiel d'oxydo-réduction du moût et respectivement sur la quantité d'oxygène dissous dans le moût. En l'occurrence, la fermentation du moût s'amorcera en présence d'un potentiel élevé d'oxydo-réduction.

Le tableau 2 fait voir encore que l'addition de la bentonite, en comparaison avec le sulfitage, a un effet contraire sur l'acidité titrée et réelle du moût. L'augmentation de la dose de bentonite amène la diminution de l'acidité du moût. Cette propriété est plus ou moins prononcée avec les différentes bentonites.

L'augmentation de la dose de bentonite améliore la limpidité du moût. Il s'ensuit cependant que le volume du précipité augmente de 70 à 250 ml. Dans la dernière variante à 200 g/hl de bentonite, le volume du précipité constitue environ 50 p. 100 du volume total du moût d'essais. Il y aurait donc des inconvénients à utiliser des doses élevées de bentonite pour clarifier le moût.

La couleur de la prise d'essai passe vite du verdâtre au brun, couleur typique du moût fortement oxydé. L'augmentation de la dose de bentonite fait baisser l'intensité de ce processus. Cependant, en comparaison avec les variantes à anhydride sulfureux, les variantes à faibles doses de bentonite, changent plus vite de couleur.

L'analyse succincte des résultats obtenus conduit à la conclusion que l'anhydride sulfureux, en tant qu'inactivateur de la polyphénoloxydase, a en vinification, un effet bien plus grand que la bentonite.

CONCLUSION

Les recherches effectuées font voir que l'oxydation du moût provenant du cépage *Muscat rouge* s'effectue d'une façon plus énergique que dans le cas du moût provenant du cépage *Dimiat*. Il s'y forme aussi plus de quinones. C'est ainsi que, une une heure après l'obtention du moût, les quantités de quinones sont respectivement de 8,61 et 2,87 mg/l. Quatre heures après l'obtention du moût, elle est de 19,47 mg/l pour le cépage *Muscat rouge* et 8,40 mg/l pour le cépage *Dimiat*.

L'anhydride sulfureux et la bentonite agissent comme inactivateurs de la polyphénoloxydase du moût. L'augmentation de la dose d'anhydride sulfureux diminue l'activité de la polyphénoloxydase du moût. Les doses au-dessus de 5 g/hl d'anhydride sulfureux inactivent la polyphénoloxydase du moût.

L'effet inactivateur de la bentonite se manifeste à l'égard du moût provenant du cépage *Dimiat* à la dose de 40 g de bentonite par hl de vin et à l'égard du moût provenant du cépage *Muscat rouge* lors d'un traitement à 150 g/hl.

L'anhydride sulfureux en tant qu'inactivateur de la polyphénoloxydase, a en vinification, un effet plus grand que la bentonite.

Reçu pour publication en novembre 1966.

SUMMARY

ON THE BIOLOGICAL OXIDATION OF GRAPE MUST.

II. — A COMPARATIVE STUDY OF SULPHUR DIOXIDE AND OF BENTONITE RN AS INACTIVATORS OF GRAPE MUST POLYPHENOLOXIDASE

The knowledge of the actual effect of sulphur dioxide and bentonite, both inactivators of polyphenoloxidase, is of primary importance in the production of high quality wines.

The purpurogallin method of WILLSTATER and STOLL (1918) modified by KEILLIN and MANN (1938) was used to determine this ferment, and the sensitive qualitative reaction was resorted to by means of phenylenediamine and pyrocatechol. The quinones were determined according to the method of RODOPOULO (1954).

Experiments were carried out on the must of the Bulgarian varieties of vine *Red Muscat* and *Dimist*. The must was treated with sulphur dioxide and bentonite, given at varying doses.

The experiments showed that oxidation of the must of *Red Muscat* is more energetic than that of *Dimist*.

Sulphur dioxide and bentonite both acted as inactivators of the must polyphenoloxidase. For sulphur dioxide, the effect increased with increasing dose, complete inactivation occurring after doses exceeding 5 g/hl. With bentonite, 40 g/hl was required to inactivate the enzyme in the must of *Dimist*, and 150 g/hl in the must of *Red Muscat*. Treatment of the must with bentonite produces two to five times the volume of precipitate produced by sulphur dioxide. This leads to practical disadvantages.

The inactivating effect of sulphur dioxide on polyphenoloxidase is stronger than that of bentonite, whence its great importance in vinification.

RESUMEN

LA OXIDACIÓN BIOLÓGICA DEL MOSTO DE UVA.

II. — ESTUDIO COMPARADO DEL ANHÌDRIDO SULFUROSO Y DE LA BENTONITA RN COMO ELEMENTOS INACTIVADORES POLIFENOLOXIDASA DEL MOSTO DE UVA

El conocimiento del efecto real del anhídrido sulfuroso y de la bentonita como elementos inactivadores de la actividad de la polifenoloxidasa, presenta una importancia primordial por lo que respecta a la producción de vinos de alta calidad.

Para determinar este fermento, hemos utilizado el método a la purpurogalina de WILLSTATER y STOLL (1918), modificado por KEILLIN y MANN (1938) y recurriendo para ello a la reacción cualitativa sensible, por medio de :

— fenilenediamina y de pirocatequina. Las quinonas han sido a su vez determinadas según el método de RODOPOULO (1954).

Se han efectuado sendos ensayos por medio del mosto procedente de la variedad de cepas búlgaras *Moscatel rojo* y *Dimist*. El mosto fue tratado mediante el anhídrido sulfuroso y la bentonita, aplicados en dosis variables.

Los ensayos efectuados han servido para demostrar que la oxidación del mosto procedente de la cepa *Moscatel rojo* es más enérgica que aquella del mosto de la cepa *Dimist*.

El anhídrido sulfuroso y la bentonita se comportan como inactivadores en relación con la polifenoloxidasa del mosto. El aumento de la dosis de anhídrido sulfuroso disminuye la actividad de la polifenoloxidasa del mosto. Las dosis de anhídrido sulfuroso superiores a 5 g por hl inactivan la polifenoloxidasa del mosto.

El efecto inactivador de la bentonita sobre el mosto de la variedad de cepa *Dimist* se pone de manifiesto si se trata a este último con una proporción de 40 g por hl de bentonita. Para el mosto de la variedad de cepa *Moscatel rojo*, el tratamiento debe ser llevado a cabo con una proporción de 150 g por hl de bentonita.

Si se trata el mosto por medio de la bentonita, se forma un precipitado de 2 a 5 veces más voluminoso que cuando se procede al tratamiento por medio del anhídrido sulfuroso. En la práctica, ello da origen a ciertos inconvenientes.

El efecto inactivador del anhídrido sulfuroso en relación con la polifenoloxidasa es más pronunciado que aquel de la bentonita, de lo cual se deriva su gran importancia en vinificación.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BAYER E., BORN F., REUTCHER K., 1957. Über die Polyphenoloxydase der traube. *Z. Lebensmitt. Unters. Forsch.*, **105**, 2, 77.

BOTTCHER H., 1961. Die aktivität der Peroxydase und Polyphenoloxydase in frischem Gemüse. *Z. Lebensmitt. Unters. Forsch.*, **115**, 6, 527.

DEIBNER L., RIFAÏ H., 1963 *a*-I. Über die Bestimmung der aktivität der Polyphenoloxydase mit Hilfe der elekrophotometrichen methode mit Purpurogallin. *Mitt. Rebe und Wein*, **56**, Klosterneuburg.

DEIBNER L., RIRAÏ H., 1963 *b*-II. Veränderungen der Polyphenoloxydase aktivität im Traubensaft Während der konservierung. *Mitt. Rebe und Wein*, **113**, Klosterneuburg.

IVANOV T., 1954. Technologie améliorée du vin de Singoularé. *Trav. sci. VIHVP, Plovdiv*, **1**, 164.

IVANOV T., 1959. Sur la technologie du *Muscat blanc* de Singoularé. *Trav. sci. VIHVP, Plovdiv*, **5**, 285.

IVANOV T., 1963. Élaboration de meilleurs coupages en vue de la production de vins mousseux de haute qualité. *Losarstvo i vinarstvo*, **5**, 28.

KEILLIN D., MANN T., 1938. Polyphenoloxydase, purification, nature and properties. *Proc. r. Soc.*, B, **125**, 187.

MAYER-OBERPLAN M., 1956. *Das Schönon und Stabilisieren von Wein, Schaumwein und süsspnost.* Franckfurt/Main, Deutschland.

NILOV V., 1961. L'utilisation de la bentonite pour éliminer les ferments oxydants du moût. *Vinodel. Vinograd.*, U. R. S. S. **8**, 13.

RODOPOULO A., 1954. Les processus d'oxydo-réduction dans le moût de vin et le vin. *Trudy VNII « Magaratch »*, U. R. S. S. **4**, 3.

RODOPOULO A., 1962. Sur les processus biochimiques en vinification, Moscva, U. R. S. S.

SISSAKIAN N., VASSILEVA H., 1945. Mécanisme de la stabilisation de l'acide ascorbique au moyen d'acide sulfureux. *Biokhimija*, **10**, 117. AN U. R. S. S.

WILISTATTER R., STOLL A., 1918. Über die Peroxydase. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **416**, 21.

WILLSTATTER R., 1928. Untersuchung über Enzyme, B 1.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (2), 89-107.

VARIATIONS QUANTITATIVES DES ACIDES ORGANIQUES STABLES, NON CÉTONIQUES, NON VOLATILS, DANS LES BAIES DE RAISIN PLACÉES EN ANAÉROBIOSE CARBONIQUE

II. — Influence de la durée d'anaérobiose

C. FLANZY, P. ANDRÉ, M. FLANZY, Y. CHAMBROY,
avec la collaboration technique de Geneviève Migliori.,

Station de Technologie des Produits végétaux, 84 - Montfavet,
Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne,
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Ce mémoire a pour objet de préciser la cinétique d'évolution des acides organiques non volatils des baies de raisin, placées en anaérobiose carbonique ; le rôle et l'importance de chaque acide sont analysés dans ces conditions. Ce mémoire est la suite d'une étude précédente (1).

INTRODUCTION

Le premier mémoire a situé le problème et le facteur température y a été étudié. Le travail actuel relate l'étude du facteur « durée de macération » réalisée à partir de la récolte 1965.

MÉTHODES ET TECHNIQUES — EXPRESSION DES RÉSULTATS

Dans une vigne de *Carignan Noir* du Domaine expérimental de Pech-Rouge, nous avons prélevé des grappes maîtresses et saines, exposées à l'est et de maturité apparente identique. Chaque grappe a donné un ensemble de baies saines et de grosseur moyenne (petites et grosses baies ont été rejetées).

(1) La première partie de ce mémoire a paru dans les *Ann. Technol. agric.*, 1967, **16** (1).

Cet ensemble est distribué à raison de un grain pour chaque échantillon composant l'essai ; l'échantillon est formé au total de 350 ± 2 grains. Des bocaux Keller de 1,5 l préalablement saturés de CO_2 reçoivent les grains et sont à nouveau balayés par un courant de CO_2 après leur remplissage.

— Le nombre d'échantillons étant limité par nos possibilités ultérieures d'analyses, une seule température de macération a été utilisée. Nous avons choisi 35°C car les transformations accompagnant la fermentation intracellulaire y sont plus rapides qu'à des températures moins élevées et l'étude cinétique des phénomènes en est facilitée (FLANZY et *al.* 1967, I). Les bocaux sont donc placés dans une enceinte thermostatée à 35°C. Quatre bocaux sont analysés pour chaque durée de macération, soit après : 0 — 2 — 4 — 6 — 10 — 15 — 28 jours de macération. Le moût provenant des baies écrasées dans les bocaux est séparé des raisins (ce moût provenant des baies écrasées durant la macération représente respectivement 5, 10 et 20 p. 100 du jus obtenu par pressurage doux après 4, 10 et 28 jours de macération). Les raisins de chaque bocal sont pressurés deux fois au pressoir pneumatique sous 3 kg/cm² (le pressoir est lui-même placé dans une enceinte saturée de CO_2).

Des parties aliquotes des 4 moûts sont mélangées et 100 ml de ce mélange sont fixés à l'alcool bouillant.

Chaque solution alcoolique ainsi obtenue représente donc l'échantillon moyen de 4 fois 350 grains.

— Un deuxième essai a été effectué 8 jours après le premier dans des conditions identiques à partir d'une nouvelle vendange. Les durées de macération choisies ont été alors de : 0 — 3 — 5 — 8 jours. Cet essai devait nous permettre de préciser les résultats obtenus lors du premier essai.

La purification des extraits et les analyses d'acides organiques ont été conduites selon la technique déjà citée de ROUX-LESAINT ; mais nous lui avons apporté deux modifications :

— La première est relative à l'extraction et à la récupération des acides tartrique, citrique et de leurs sels. En effet, au cours de notre expérimentation de 1964, nous avions constaté que les valeurs aberrantes obtenues pour ces deux acides dans certains échantillons pouvaient s'expliquer par des récupérations incomplètes des sels de ces acides fixés sur les parois des flacons de stockage.

Nous avons remédié à ce défaut, en pratiquant l'agitation classique de l'extrait aqueux avec de la résine échangeuse de cations forme H^+ dans le bocal même ayant contenu l'échantillon.

— La deuxième modification porte sur la révélation des acides en chromatographie sur papier. Nous employons pour réactif général le mélange de PASKOVA-MUNK (1960), vert de bromocrésol—bleu de bromophénol — permanganate de potassium — carbonate de sodium, « qui a l'avantage de donner des teintes nettement différenciées avec les divers acides » (JOLIVET, 1963).

Les acides shikimique et quinique sont identifiés par le réactif au métaperiodate de CARTWRIGHT-ROBERTS (1955).

Les acides fumarique et succinique sont identifiés, outre le révélateur principal, par le réactif de MARTIN (1955) : ferrocyanure de potassium — sulfate ferrique ammoniacal — ammoniaque.

Enfin, nous avons essayé de séparer les acides shikimique et quinique par chromatographie sur résine échangeuse d'anions Dowex II forme acétate.

Expression des résultats

1. Les quantités d'acides sont exprimées en microéquivalents par litre de jus. Elles sont données dans deux tableaux :

— le tableau 1 représente les résultats obtenus dans le 1er essai.
— le tableau 2 représente les résultats obtenus dans le 2e essai

TABLEAU I

Évolution des acides organiques dans le 1er essai -A-

Jours → / Acides ↓	T	2	4	6	10	15	28
Quinique + shikimique	950	1 200	1 600	1 700	1 760	2 470 ?	2 140
Succinique	# 0	790	1 100	1 800	2 400	2 500	3 250
Malique	57 000	44 000	37 000	36 000	31 000	28 700	28 000
Tartrique	76 000	x	67 000	x	x	x	53 000
Citrique	1 300	x	1 100	1 200	2 150	1 120	1 100
Fumarique	# 0	traces 90	450	370	160	650	270

2. Bien que la récupération d'acide tartrique selon la technique décrite dans le chapitre précédent soit bonne, nous n'avons pu obtenir de valeurs correctes de cet acide que pour 4 échantillons sur les 11 analysés. En effet, tant par chromatographie sur silice que sur Dowex, les quantités d'acide tartrique séparées étaient le plus souvent trop fortes ; ce qui conduisait à l'obtention de rendements chromatographiques en acides totaux supérieurs parfois à 100 p. 100.

Nous n'avons pu mettre en évidence l'élément qui interférait avec le pic de l'acide tartrique dans le cas des analyses défectueuses. Ce phénomène est d'autant plus curieux que nous avons employé la même technique pour les analyses correctes donnant des rendements de 80 p. 100.

TABLEAU 2

Évolution des acides organiques dans le 2e essai -B-

Jours → / Acides ↓	T	3	5	8
Quinique + shikimique ...	1 630	1 770	1 870	1 890
Succinique.....	0	1 500	1 700	2 200
Malique.....	60 000	52 000	39 000	31 000
Tartrique.....	72 900	*x*	*x*	71 600 ?
Citrique	1 200	1 770	1 100	1 190
Fumarique	0	260	100	160

3. a) *La séparation du mélange quinique-shikimique* par résine Dowex II n'a pu être réalisée que 2 à 3 mois après l'obtention de ce mélange par chromatographie sur Dowex I. Aussi ne peut-on donner les pourcentages respectifs de ces deux acides et l'évolution de ces pourcentages au cours de la macération.

b) *Par chromatographie sur papier* et révélation avec réactif général et spécifique, il semble que l'acide shikimique forme la plus grande partie du mélange. Nous n'avons pas trouvé trace d'acide glycérique.

c) *Dans le deuxième essai,* les valeurs du mélange quinique-shikimique sont plus élevées que dans le premier essai. En outre, par chromatographie sur papier, une tache supplémentaire est apparue. Le corps correspondant à cette tache n'a pu être identifié d'une façon certaine : il s'agit peut-être d'acide uronique.

RÉSULTATS

Généralités

L'acide malique disparu pour chaque durée de macération est exprimé en pourcentage de l'acide malique du témoin, dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Pourcentage d'acide malique total disparu

Durée de macération (jours)	2	3	4	5	6	8	10	15	28
Essai A	23		35		37		45,5	50	51
Essai B.....		13		34		48			

Le tableau 4 donne les taux d'acide malique disparu dans les essais de PEYNAUD-GUIMBERTEAU (1962) et CHAUVET et *al.* (1963).

TABLEAU 4

Pourcentage d'acide malique total disparu selon divers auteurs

Essai	Macération (°C)	Cépage	Durée de macération			
			8	10	12	15
Pech-Rouge 1965. Essai A.....	35	*Carignan Noir*		45,5		50
Pech-Rouge 1965. Essai B.....	35	*Carig ıan Noir*	48			
PEYNAUD-GUIMBERTEAU 1961	25	7 cépages du Bordelais	31			
CHAUVET et *al.* 1962.....	25	*Gamay Noir* à jus blanc			25	
BRECHOT et *al.*, 1965.....	20	» » »		20		

Le tableau 5 représente les pertes partielles, en pourcentage, survenues entre deux durées de macération. Chaque perte partielle journalière est assimilée à la vitesse actuelle de dégradation de l'acide.

Le tableau 6 donne le pourcentage d'acide malique contenu dans les échantillons *Grenache* 1964 par rapport aux échantillons 1965 pris après les mêmes durées de macération.

L'acide succinique accumulé après chaque durée de macération est rapporté à l'acide succinique de l'échantillon « 28 jours » pris arbitrairement comme référence. Les pourcentages ainsi obtenus sont donnés dans le tableau 7.

Le tableau 8 représente les gains partiels p. 100 et les vitesses d'accumulation du succinique.

Le tableau 9 compare les productions d'alcool et d'acide succinique dans nos essais (1964 et 1965) et dans ceux de LAFON (1959) portant sur la fermentation alcoolique par les levures.

Dans le tableau 10, nous avons calculé les poids de C contenu dans les quantités d'acide malique, d'alcool et d'acide succinique de chaque échantillon.

Dans le tableau 11, les quantités totales de l'ensemble quinique + shikimique accumulées après chaque durée de macération, sont rapportées à la valeur du mélange de l'échantillon « 28 jours » pris comme référence. Les calculs se font à partir des quantités obtenues par dosage auxquelles on retranche la teneur initiale du témoin.

Le tableau 12 représente les gains partiels p. 100 et les vitesses d'accumulation du mélange quinique + shikimique.

Observations

En dehors de l'évolution de ces acides, il faut noter un phénomène qui peut revêtir une grande importance.

TABLEAU 5

Pertes partielles p. 100 et vitesse de dégradation de l'acide malique

Intervalles de macération	0 à 2 jours		0 à 3 jours		2 à 4 jours		3 à 5 jours		4 à 6 jours		5 à 8 jours		6 à 10 jours		10 à 15 jours		15 à 28 jours	
Pech-Rouge 1965	Perte partielle %	V	PP %	V	PP %	V	PP %	V	PP %	V	PP %	V	PP %	V	PP %	V	PP %	V
Essai A	23	11,5			12	6			2	1			8,5	2,1	4,5	< 1	1	< 0,1
Essai B			13	6,5			21	10			14	< 5						

TABLEAU 6

Pourcentage d'acide malique des échantillons de Grenache *1964 aux échantillons de* Carignan *1965*

Durée de macération (j.)	5	10	17	31
P. 100 $\frac{1964}{1965}$	33	30	28	27

TABLEAU 7

Pourcentage d'acide succinique produit

Durée de macération	2	4	6	10	15	28
P. 100	24	34	55	74	77	100

TABLEAU 8

Gains partiels et vitesses d'accumulation d'acide succinique

Intervalles de macération	0 à 2		2 à 4		4 à 6		6 à 10		10 à 15		15 à 28	
	Gains partiels	V	G. P.	V	G. P.	V	G. P.	V	G. P.	V	G. P.	V
	24	12	0 10	5	21	10,5	19	< 5	3	0,6	23	1,7

TABLEAU 9

Productions comparées d'acide succinique et d'alcool

Essais	Alcool (g/l)	Succinique (méq./l)
LAFON	11	4,2
Pech-Rouge 1965	9,8	2,4
Pech-Rouge 1965	12,9	2,5
Essai 1964	13,9	3
LAFON	36	8,2
Essai 1964	31,7	5,3

TABLEAU 10

Rapports en poids de C
— de l'alcool à l'acide malique
— de l'acide malique au succinique

Jours	Alcool (mg/l)	$\frac{z'}{C}$ alcool (mg/l)	$\frac{2\,z'}{C}$ alcool + Cco_2	$\frac{2\,z'}{x'}$	$\frac{x'}{C}$ malique	$\frac{x'}{y'}$	$\frac{y'}{C}$ succinique
2	4,4	2 288	4 576	15	312	16,4	19
4	7,8	4 500	9 000	18,5	480	18,2	26,4
6	9,1	4 730	9 460	18,5	504	11,6	43,2
10	9,8	5 100	10 200	16,5	624	10,8	57,6
15	12,9	6 700	13 400	19,5	680	11	60
28	14,2	7 380	14 760	20	690	8,8	78
3	6,2	3 220	6 440	34	192	5,3	36
5	8,7	4 530	9 060	20	490	12	40,8
8	9,4	4 890	9 780	14	690	13	52,8

TABLEAU 11

Pourcentage de mélange quinique + shikimique produit

Durée de macération	2	4	6	10	15	28
P. 100	21	54,5	63	68		100

TABLEAU 12

Gains partiels et vitesses d'accumulation du mélange quinique + shikimique

Intervalles de macération	0 à 2		2 à 4		4 à 6		6 à 10		10 à 28	
	Gains partiels	V	G. P.	V	G. P.	V	G. P.	V	G. P.	V
	21	10,5	33,5	< 17	8,5	> 4	5	2,5	32	1,7

Lors de nos essais, nous avons noté, dans les premières heures de fermentation intracellulaire, une forte absorption du CO_2 contenu dans les bocaux par les baies de raisin : 274 ml de CO_2 pour un kg de raisins représentant 945 ml.

Cette première phase était suivie par le stade dégagement de CO_2 dû à la fermentation intracellulaire. Ces résultats ont été vérifiés par des mesures au Warburg qui n'ont pas permis, jusqu'à présent, de préciser si le CO_2 ainsi absorbé était seulement dissous dans le suc cellulaire ou s'il était métabolisé par le raisin.

Ce phénomène ne se produit pas en atmosphère d'azote (travaux en cours). On peut donc s'attendre à des différences entre des échantillons placés respectivement dans l'une ou l'autre des formes d'anaérobiose.

Durant notre expérimentation 1965, certains bocaux ont été placés en atmosphère d'azote et peuvent ainsi nous servir de termes de comparaison avec leurs homologues remplis de CO_2. Les résultats de nos essais ne sont pas encore dépouillés.

Mais d'ores et déjà, il semble qu'il ne faille pas confondre anaérobiose carbonique et anaérobiose en atmosphère d'azote.

En effet, dans le premier cas, une assimilation de CO_2 par les cellules végétales, de fruits en particulier (Ulrich-Landry), est possible et le métabolisme des acides organiques risque d'en être affecté. Le CO_2 se retrouve alors surtout sous forme d'acide malique comme semble l'avoir montré Drawert et *al.* (1966) dans le raisin.

Acide malique

Les pourcentages d'acide malique disparu dans nos essais (tabl. 3) sont supérieurs à ceux attribués par d'autres auteurs (tabl. 4) à la seule fermentation intracellulaire. Cette différence s'explique en partie par la température de macération plus élevée dans nos essais que dans ceux signalés ci-dessus ; en effet, dans la première publication nous avons vu que l'augmentation de température faisait croître, en valeur absolue, la disparition de l'acide malique.

L'influence du facteur cépage et de la concentration en acide malique dans le processus de dégradation de cet acide ne peut être mise en évidence par le simple examen de ce dernier tableau ; de même, la comparaison avec nos résultats 1964 sur *Grenache*, ne peut donner lieu à une interprétation rigoureuse (les teneurs initiales de l'acide malique étant inconnues pour le *Grenache*).

En faisant abstraction de la vitesse entre 4 et 6 jours qui semble anormalement basse, l'examen du tableau 5 montre que la vitesse de dégradation décroît et tend vers zéro lorsque la durée de macération augmente. La loi de décroissance n'est cependant pas connue. En effet, si la courbe 1, représentant les teneurs en acide malique en fonction du temps de macération, a une allure exponentielle, elle n'est cependant pas sous forme de droite en représentation semi-logarithmique.

L'examen de cette courbe montre que, dans les conditions de nos essais :

— la moitié du malique initial a disparu après 14,5 jours ;

— la quantité finale de malique dégradé semble tendre vers une valeur proche de la moitié du malique initial.

On peut remarquer que l'acidité totale des échantillons suit une évolution parallèle à celle de l'acidité malique.

La comparaison des teneurs en acide malique des essais 1964 et 1965 montre que les quantités d'acide tartrique et d'acide citrique sont sensiblement identiques

dans le *Grenache Noir* 1964 et le *Carignan Noir* 1965 ; en revanche les teneurs en acide malique sont très différentes.

On peut estimer que la différence d'acidité organique totale provient presque exclusivement de l'acide malique.

Pour le *Carignan* 1965, l'acide malique du témoin représente environ 42 p. 100 de l'acidité totale organique (tabl. 6). Après 4 jours de macération, il n'est plus que de 34 p. 100. Pour le *Grenache* 1964 l'acide malique titré après 5 jours de macération à 35°C, représente 14 p. 100 de l'acidité totale organique.

Acide succinique

La vitesse d'accumulation (tabl. 8) semble décroître assez régulièrement. La figure 3 donne les teneurs en succinique en fonction de la durée de macération,

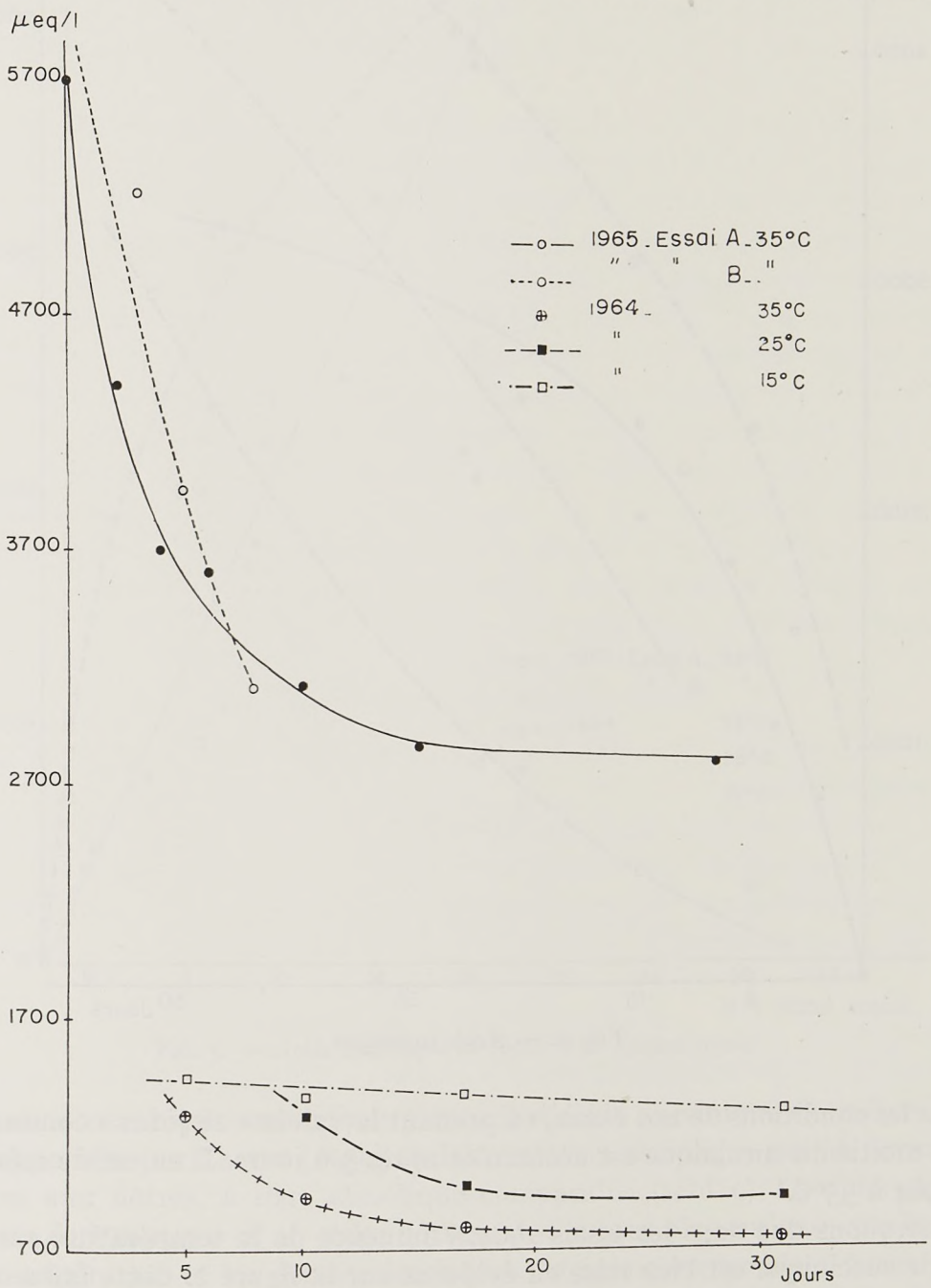


FIG. 1. — *Acide malique*

pour les essais 1964 et 1965. La courbe représentative des essais 1965 n'est pas de forme exponentielle. Elle semble tendre vers une limite, ce qui rejoint les phénomènes observés dans la dégradation de l'acide malique et la production d'alcool (P. ANDRÉ, FLANZY C., non publié).

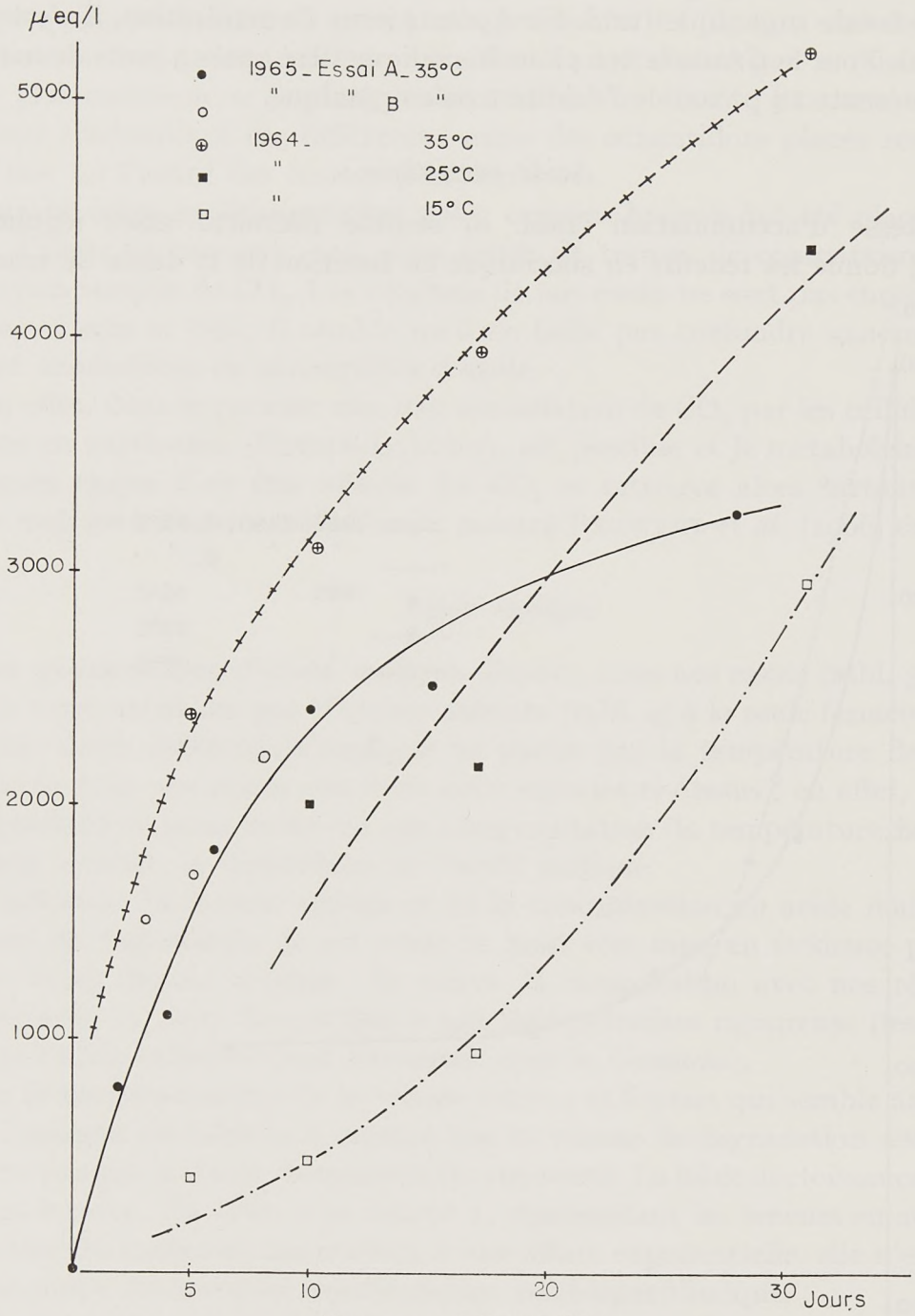


FIG. 2. — *Acide succinique*

Dans les conditions de nos essais, en prenant la valeur « 28 jours » comme valeur finale, la moitié du succinique est accumulée après 5-6 jours. Il en est de même pour l'essai 1964 à 35°C.

Remarquons que dans les essais 1964, l'influence de la température sur la production de succinique est bien mise en évidence sur la figure 2. Cette influence a été envisagée dans le mémoire précédent.

Les teneurs obtenues avec le *Carignan* 1965 sont du même ordre de grandeur mais plus faibles que celles du *Grenache* 1964 macéré à 35°C.

Les quantités d'acide succinique accumulées dans nos essais sont plus faibles que celles données par la littérature. En effet, PEYNAUD-GUIMBERTEAU (1962)

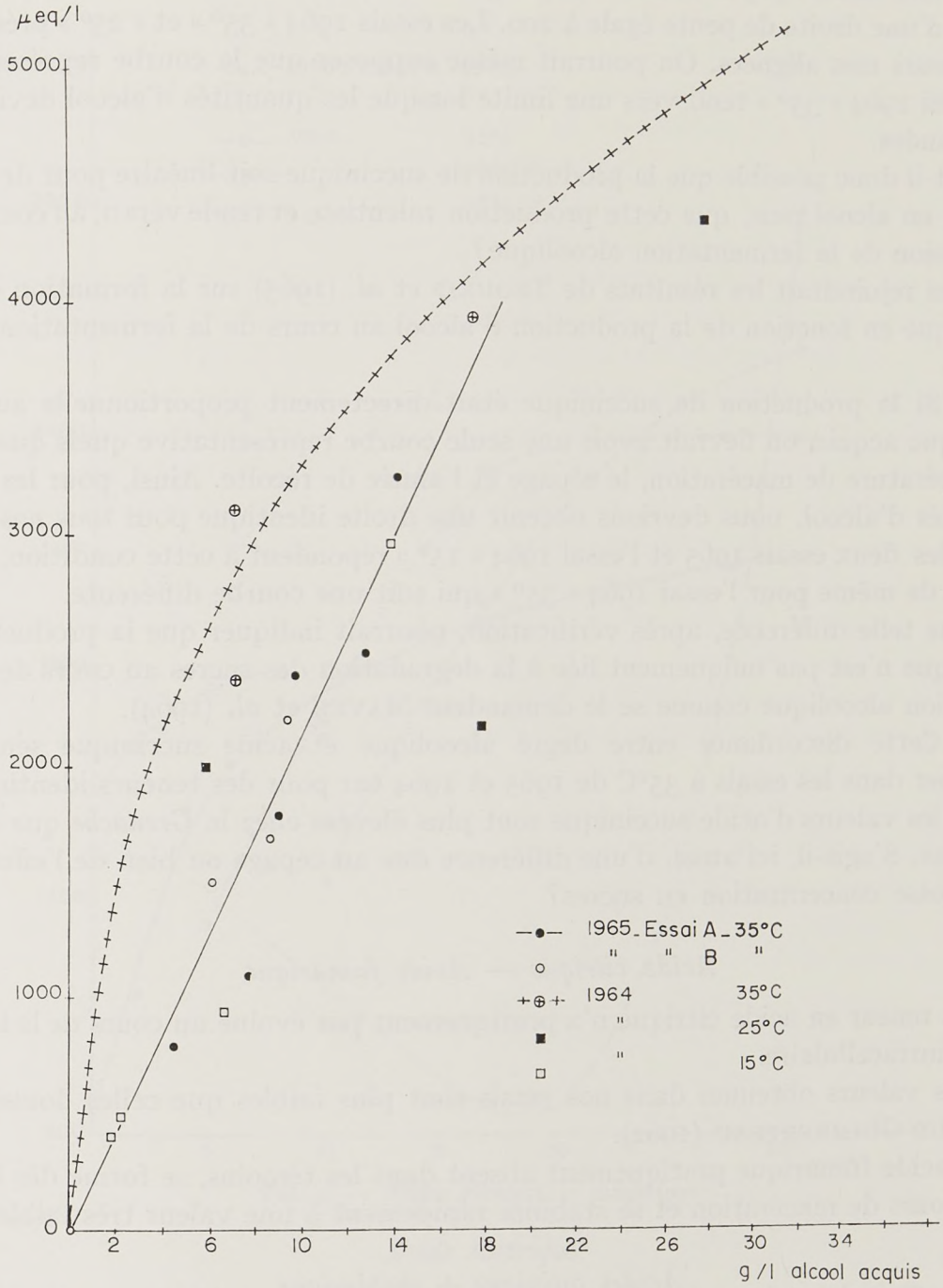


FIG. 3. — *Acide succinique en fonction de l'alcool acquis*

trouvent en anaérobiose carbonique 5 méq./l d'acide succinique de même que les valeurs rapportées par LAFON (1959) en fermentation alcoolique par les levures sont supérieures aux nôtres, à titre alcoolique comparable (tabl. 9). La différence entre les résultats de PEYNAUD et *al.* et les nôtres est d'autant plus curieuse que la température de macération et les degrés alcooliques atteints correspondent à nos propres zones de travail. Cette différence est-elle due aux cépages ?

Il était intéressant d'observer l'évolution de l'acide succinique en fonction du degré alcoolique atteint. L'examen de la figure 3, où nous avons représenté les teneurs des échantillons en acide succinique en fonction de la quantité d'alcool acquise, nous conduit à faire trois remarques :

1. Les essais 1965 A et B et 1964 « 15°C » ont de valeurs distribuées sensiblement le long d'une droite de pente égale à 200. Les essais 1964 « 35° » et « 25° » présentent des valeurs non alignées. On pourrait même supposer que la courbe représentative de l'essai 1964 « 35° » tend vers une limite lorsque les quantités d'alcool deviennent très grandes.

Est-il donc possible que la production de succinique soit linéaire pour de faibles teneurs en alcool puis, que cette production ralentisse et tende vers 0, au cours de la progression de la fermentation alcoolique ?

Ceci rejoindrait les résultats de THOUKIS et *al.* (1965) sur la formation d'acide succinique en fonction de la production d'alcool au cours de la fermentation par la levure.

2. Si la production de succinique était directement proportionnelle au degré alcoolique acquis, on devrait avoir une seule courbe représentative quels que soient la température de macération, le cépage et l'année de récolte. Ainsi, pour les faibles quantités d'alcool, nous devrions obtenir une droite identique pour tous nos essais. Or, si les deux essais 1965 et l'essai 1964 « 15° » répondent à cette condition, il n'en est pas de même pour l'essai 1964 « 35° » qui suit une courbe différente.

Une telle différence, après vérification, pourrait indiquer que la production de succinique n'est pas uniquement liée à la dégradation des sucres au cours de la fermentation alcoolique comme se le demandent MAYER et *al.* (1964).

3. Cette discordance entre degré alcoolique et acide succinique semble se confirmer dans les essais à 35°C de 1965 et 1964 car pour des teneurs identiques en alcool, les valeurs d'acide succinique sont plus élevées chez le *Grenache* que chez le *Carignan*. S'agit-il, ici aussi, d'une différence due au cépage ou bien de l'effet d'une plus grosse concentration en sucres ?

Acide citrique — Acide fumarique

La teneur en acide citrique n'a pratiquement pas évolué au cours de la fermentation intracellulaire.

Les valeurs obtenues dans nos essais sont plus faibles que celles données par PEYNAUD-GUIMBERTEAU (1962).

L'acide fumarique pratiquement absent dans les témoins, se forme dès les premiers jours de macération et se stabilise rapidement à une valeur très faible.

Acides quinique + shikimique

La vitesse d'accumulation passe par un maximun entre 2 et 4 jours, puis décroit brutalement (tableau 12). En prenant la valeur 28 jours pour valeur finale, la moitié du mélange accumulé est obtenue vers le 4e jour. La courbe représentative (figure 5) semble tendre vers une limite.

Rappellons que l'allure caractéristique de la courbe représentant l'essai 1964 « 15°C » montre l'anomalie dans l'accumulation du mélange pour cette température. Cela a été noté dans le mémoire précédent.

Remarquons que les valeurs du mélange sont plus élevées en 1964 qu'en 1965, à partir du 10e jour de macération (pour les essais à 35°C).

A 25° et 35° les quantités du mélange des deux acides augmentent avec la durée de macération.

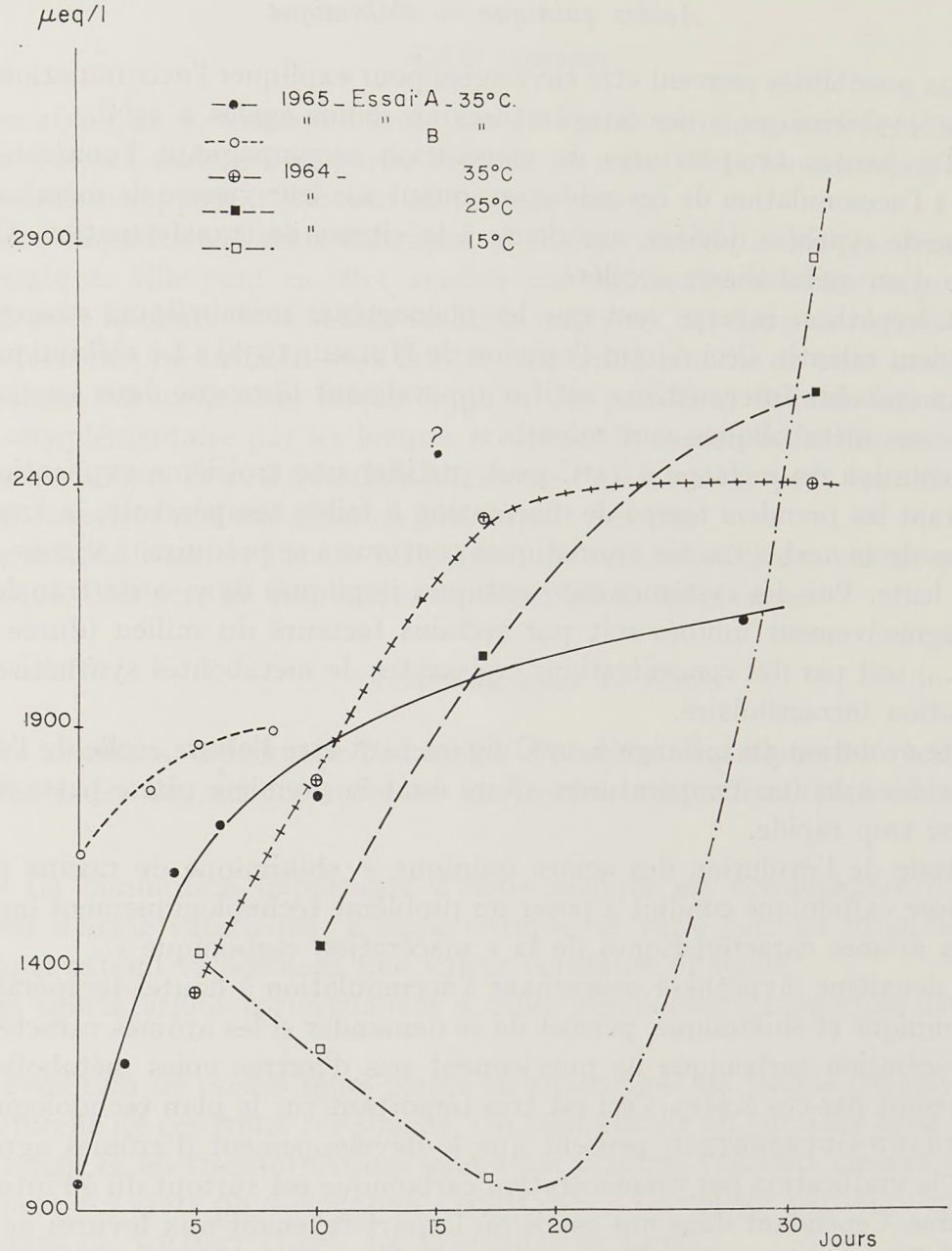


FIG. 4. — *Acides quinique + shikimique*

Acide tartrique

Les valeurs d'acide tartrique trouvées pour le témoin et les échantillons 4 et 28 jours de la première série d'essais 1965, montrent une disparition de l'acide tartrique au cours de la fermentation intracellulaire.

En effet, 12 p. 100 et 40 p. 100 de la quantité initiale de cet acide ont été dégradés respectivement en 4 et 28 jours. Ceci rejoint, approximativement, les pourcentages obtenus en 1964 à 35° avec du *Grenache* : en prenant pour référence la quantité de tartrique après 5 jours de macération, les pourcentages de dégradation sont de 13 p. 100 au 10e jour et de 21 p. 100 au 31e.

CONCLUSION

Acides quinique + shikimique

Deux possibilités peuvent être envisagées pour expliquer l'accumulation d'acides quinique + shikimique à des températures au moins égales à 25°C.

1. De hautes températures de macération accompagnant l'anaérobiose conduisent à l'accumulation de ces acides en jouant sur leur vitesse de métabolisation : la vitesse de synthèse devient supérieure à la vitesse de transformation. On est en présence d'un métabolisme accéléré.

2. L'hypothèse inverse veut que les phénomènes métaboliques concernant ces acides soient ralentis. Ceci rejoint l'opinion de HULME (1958) « Le shikimique semble être un métabolite intermédiaire actif n'apparaissant libre que dans les tissus dont les processus métaboliques sont ralentis. »

L'évolution du mélange à 15°C peut justifier une troisième explication :

Durant les premiers temps de macération à faible température, la transformation normale en acides aminés aromatiques continue à se produire, à vitesse régulière et assez lente. Puis les systèmes enzymatiques impliqués dans cette transformation sont progressivement inhibés soit par certains facteurs du milieu (durée d'action du CO_2 ...) soit par des concentrations croissantes de métabolites synthétisés dans la fermentation intracellulaire.

Cette évolution du mélange à 15°C figure peut-être l'allure réelle de l'évolution de ces acides à hautes températures, allure dont la première phase passe inaperçue parce que trop rapide.

L'étude de l'évolution des acides quinique + shikimique de raisins placés en anaérobiose carbonique conduit à poser un problème technologiquement important : celui des arômes caractéristiques de la « macération carbonique ».

La deuxième hypothèse concernant l'accumulation à hautes températures des acides quinique et shikimique, permet de se demander si les arômes caractéristiques de la macération carbonique ne proviennent pas d'autres voies métaboliques que celles passant par ces acides. Ceci est très important sur le plan technologique.

PEYNAUD-GUIMBERTEAU pensent que le développement d'arômes agréables au cours de la vinification par prémacération carbonique est surtout dû à l'intervention des levures. Cependant dans nos essais où la part revenant aux levures ne pouvait qu'être faible si même elle existait, nous avons pu constater qu'à l'ouverture des bocaux d'échantillonnage se dégageaient des arômes très fins et apparemment proches de ceux obtenus dans des conditions industrielles de macération carbonique.

La conduite de la macération carbonique à basse température ne permet-elle pas l'élaboration de vins plus fins que ceux produits à haute température, comme cela est le cas dans la vinification par la levure seule ?

Des observations effectuées en Beaujolais et une expérimentation réalisée par BENARD-JOURET (non publié) dans un chais de prémontagne semblent vérifier cette hypothèse. Cependant les vins obtenus par macération carbonique à basse température, s'ils gagnent en finesse d'arômes, risquent d'avoir des teneurs plus faibles en couleur et en extraits. Aussi, plutôt que de rechercher un « juste milieu standard »

des conditions de macération, est-il préférable, peut-être, d'adapter la vinification au type de vin recherché ; une basse température de macération pour l'obtention de vins frais, très fins et devant se consommer rapidement ; une température plus élevée pour des vins fins mais ayant suffisamment d'extrait pour être des vins de garde.

Acide tartrique

Nos résultats concernant l'évolution de l'acide tartrique sont insuffisants pour affirmer que cet acide est en partie dégradé au cours de la fermentation intracellulaire comme le supposent BÉNARD et JOURET (1963).

Cette disparition d'acide tartrique, si elle est vérifiée, a une grande importance technologique. Elle peut en effet amener une diminution d'acidité importante (en relation avec la chute de la teneur en acide malique). Or, dans les régions où les acidités totales des raisins sont déjà faibles, une chute notable de cette acidité par ces phénomènes intracellulaires risque de poser des problèmes délicats lors de la vinification complémentaire par les levures et durant la conservation des vins faits.

En revanche, la précipitation ultérieure de bitartrate peut être diminuée, ce qui doit favoriser une stabilisation plus rapide des vins.

Le métabolisme de l'acide tartrique tout comme celui des acides quinique + shikimique, doit être lié aux modes de dégradation du glucose.

Acides du cycle de Krebs

Nos résultats concernant l'évolution des acides organiques du cycle de Krebs dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique, peuvent se résumer ainsi :

— La diminution importante d'acide malique est accompagnée d'une accumulation d'acide succinique. L'acide citrique ne varie pas. La formation d'acide fumarique atteint rapidement une valeur constante et faible.

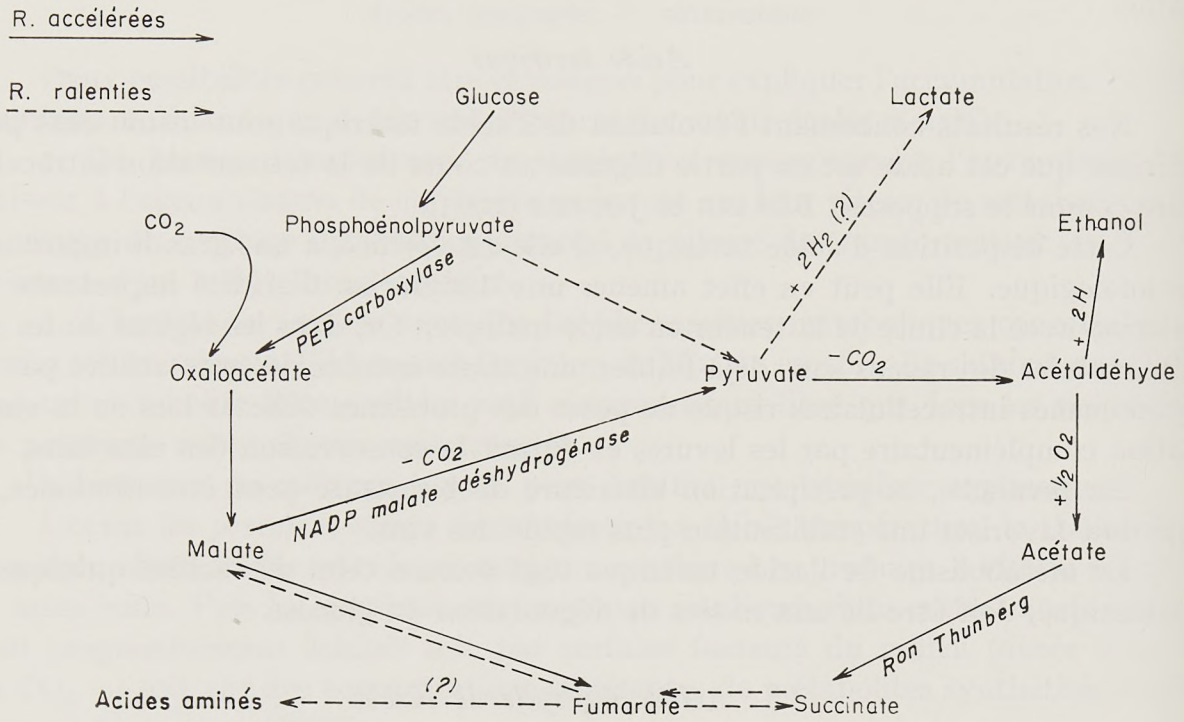
Ces constatations correspondent à celles généralement rapportées dans la littérature.

L'évolution de raisins mûrs placés en anaérobiose ne semble pas suivre l'évolution naturelle de ces fruits sur souche. On peut établir un parallèle entre cette évolution forcée et les transformations subies par d'autres végétaux amenés artificiellement dans des états physiologiques « contrariés ». On rejoint partiellement alors les conclusions de JOLIVET (1963) sur la pomme de terre.

Stœchiométriquement, la disparition d'acide malique est le phénomène principal dans l'évolution des acides organiques au cours de la fermentation intracellulaire des raisins : comment peut-on l'interpréter ?

1. L'hypothèse d'une combustion de l'acide dans une phase respiratoire accélérée et brève peut être prise en considération. Nos essais ont montré que la dégradation du malique était nettement plus accélérée à 35° qu'à 15°C dans les premiers jours de macération. Or, il est connu que l'accroissement de température accélère la diminution de cet acide au cours de la maturation des baies (M. FLANZY, 1946 ; A. OURNAC, 1962). Cependant ce phénomène, en supposant qu'il existe, n'est que de très courte durée et sa part dans la disparition globale de l'acide doit être très réduite.

2. En tenant compte que d'une part les concentrations élevées de CO_2 que nous utilisons doivent inhiber la succiniquedéshydrogénase et que d'autre part le CO_2 peut être fixé par le raisin (DRAWERT 1966), des voies métaboliques différentes sont susceptibles d'entrer en jeu. Elles sont figurées sur le schéma suivant.



Il peut y avoir fixation de CO_2 avec production de malate et décarboxylation du malate en pyruvate. Celui-ci par réduction donne du lactate et par décarboxylation de l'acétaldéhyde. Ce dernier est réduit en éthanol et une faible partie oxydée en acétate. La condensation de deux molécules d'acétate donne du succinate qui doit s'accumuler, le cycle de Krebs étant bloqué au niveau de la succinique déshydrogénase.

Cette synthèse de succinate à partir d'acétate est suggérée par le fait que l'acide citrique ne varie pas.

La PEP carboxylase et la NAPP malate déshydrogénase existent dans la baie de raisin (MEYERHARDT, 1965) mais CLIJUSTERS (1965) affirme que la production d'alcool à partir de malate par cette voie enzymatique est inhibée dans les pommes placées en atmosphère d'azote.

Il est visible, dans le tableau 10, que si tout l'acide malique dégradé suivait la voie acide malique-alcool, la part de cet acide dans la fabrication de l'alcool serait très réduite, le 1/20 environ en poids de C.

On peut aussi supposer que, sous l'influence de fortes concentrations en CO_2, le cycle de Krebs fonctionne plus rapidement dans le sens malate → fumarate → succinate. Ceci est contraire à l'opinion de RANSON (1953).

Le tableau 10 montre que l'acide malique dégradé exprimé en poids de C est bien supérieur au succinate accumulé, environ 10 fois plus. Si donc la filiation malique-succinique existait et si tout le malique dégradé se transformait en succinique, il faudrait supposer que ce dernier, à son tour, soit partiellement métabolisé ; (voie γ-aminobutyrique, 1/2 aldéhyde succinique-glutamique et entrée dans le pool des acides aminés ?).

La voie proposée par Coïc et *al.* (1965) pour la métabolisation du CO_2 dans les feuilles de *Bryophyllum*, est peut-être utilisée dans le phénomène que nous étudions.

Cependant les données expérimentales ne permettent pas d'envisager des hypothèses sur les métabolismes des acides aminés, aspartate-glutamate-α-alanine. Il en est de même pour les acides cétoniques.

Il est donc nécessaire de suivre ultérieurement les variations quantitatives de ces différents acides aminés et cétoniques. Il faudra en outre utiliser du $^{14}CO_2$ pour explorer le côté gauche du cycle de Krebs (avec la possibilité de filiation malate-succinate), de l'acétate 2-^{14}C pour vérifier la synthèse du succinate, du malate 2-^{14}C pour suivre la voie de la NADP malate déshydrogénase.

ORIENTATION GÉNÉRALE DES RECHERCHES

L'établissement des bilans concernant l'évolution des acides organiques, acides cétoniques, acides aminés, réalisé parallèlement à l'étude de la métabolisation des sucres, devrait permettre, en utilisant des précurseurs marqués, de préciser les voies biologiques suivies préférentiellement dans ce phénomène.

Sur le plan technologique, les résultats obtenus présentent un certain intérêt.

En effet, en fonction du type de vin recherché, il semblerait que l'on puisse agir efficacement sur l'évolution de certains acides en modifiant les conditions de durée et de température de macération. Ceci peut être très important, en particulier pour la production d'arômes caractéristiques.

Cependant notre travail ne traite jusqu'à présent que des baies placées en anaérobiose gazeuse. Or les baies entières noyées dans du moût de raisin, et ce moût subissant la fermentation par les levures, sont le siège de phénomènes, vraisemblablement différents de ceux obtenus en anaérobiose gazeuse.

La connaissance individuelle de ces différents phénomènes est indispensable pour préjuger de l'évolution globale d'une masse de raisin vinifiée en macération carbonique.

Enfin, l'importance de ces phénomènes les uns par rapport aux autres doit être mesurée pour pouvoir maîtriser et diriger cette vinification à notre convenance.

Reçu pour publication en décembre 1966.

SUMMARY

QUANTITATIVE VARIATIONS IN NON-KETONIC, NON-VOLATILE STABLE ORGANIC ACIDS IN GRAPE BERRIES UNDER CARBONIC ANAEROBIOSIS
II. — THE EFFECT OF THE DURATION OF ANAEROBIOSIS

Results obtained in 1964 on the entire development of certain grape organic acids under carbonic anaerobiosis are confirmed by this work :

— degradation of malic and tartaric acids,
— accumulation of succinic acid and of the quinic-shikimic acid mixture,
— slight accumulation of fumaric acid.

The kinetics of these developments were studied.
Certain metabolic paths are considered, as well as certain technological consequences.

RESUMEN

VARIACIÓNES CUANTITATIVAS DE LOS ACIDOS ORGÁNICOS ESTABLES, NO CETÓNICOS, NO VOLÁTILES, IN LAS BAYAS, DE UVAS PUESTAS IN ANAEROBIOSIS CARBÓNICO.

II. — INFLUENCIA DE LA DURACIÓN DE ANAEROBIOSIS

Este trabajo permite de confirmar los resultados obtenidos in 1964 sobre la evolución global de ciertos ácidos orgánicos de la uva puesta in anaérobiosis carbónico :

— degradación de los ácidos málico y tártrico,
— acumulación del ácido succínico, del conjunto de los ácidos quinico-shikimico,
— pequeña acumulación del ácido fumárico.

La cinética de esas evoluciones estan estudiadas.
Ciertos procesos metabólicos estan considerados y tambien algunas consecuencias tecnológicas.

RIASSUNTO

VARIAZIONI QUANTITATIVE DEGLI ACIDI ORGANICI STABILI, NON CHETONICI, NON VOLATILI, NELLE BACCHE DI UVA MESSE IN ANAEROBIOSI CARBONICA.

II — INFLUENZA DELLA DURATA DI ANAEROBIOSI

Questo lavoro conferme i risultati ottenuti nel 1964 perquanto rigarda l'evoluzione globale di certi acidi organichi dell'uva messa in anaerobiosi carbonica :

— degradazione del acido malico e tartarico,
— accumulazione del acido succinico, della miscela degli acidi chinico-shimico,
— leggiera accumulazione di acido fumarico.

La velocità di queste evoluzioni e studiata. Certe vie metabolitiche sono esaminate come pure certe conseguenze technologiche.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALLENTOFF N., PHILLIPS W. R., JOHNSTON F. B., 1954. Cité par WILLIAMS-PATTERSOBN, 1964-83.

BÉNARD P., JOURET C., 1963. Essais comparatifs de vinification en rouge. *Ann. Technol. agric.*, **12** n° 2, 85-102.

BENDALL D. S., RANSON S. L., WALKER D. A., 1960. Cité par WILLIAMS-PATTERSON, 1964.

BIALE J. B., 1964. Growth, maturation, and senescence in fruits. *Science*, **146**, 3636.

BOUDET A., 1965. *Sur quelques aspect de l'inhibition des enzymes par les tanins des feuilles* de Quercus sessilis GRLH. Thèse de spécialité. Univ. Toulouse, Fac. Sci.

CARLES J., PECH Mme R., 1960. L'acide gallique et l'acide protocatéchique produits de dégradation des anthocyanes du vin. *C. R. Acad. Sci.*, **251**, 2764-2766.

CARTWRIGHT-ROBERTS, 1955. Theogallin as a galloyl ester of quinic acid. *Chem. and Industry*, **230**.

CLIJSTERS, 1965. Malic acid metabolism and initiation of the internal breakdown in *Jonathan* Apples. *Physiol. Plant.*, **18**, 85-94.

CHAUVET J., BRÉCHOT P., DUPUY P., CROSON M., IRRMANN R., 1963. Évolution des acides malique et lactique dans la vinification par macération carbonique de la vendange. *Ann. Technol. agric.*, **12**, n° 4, 237-246.

COÏC Y., LESAINT C., LEROUX F., 1961. Comparaison des feuilles, entre-nœuds et nœuds du blé au point de vue acides organiques et cations minéraux peu avant la floraison. *C. R. Acad. Sci.*, **252**, 4031-4033.

Coïc Y., Lesaint C., Provot M., 1956. L'incorporation à l'obscurité, à la lumière et à des temps différents, de CO_2 dans les acides organiques des feuilles de *Bryophyllum daigrenontianum*. Influence de la température. *Ann. Physiol. vég.*, **7**, n° 1, 47-56.

Dilley., 1962. Cité par Clijsters, 1965.

Drawert F., Steffan H., 1966. Biochemisch-Physiologische Untersuchungen an Traubenbeeren. III.Stoffewechsel von zugeführten ^{14}C-Verbindungen und die Bedeutung des Säure-Zucker-Metabolismus für die Reifung von Traubenbeeren. *Vitis.*, **5**, 377-384.

Dupuy P., 1960. Le métabolisme de l'acide tartrique. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 139-184.

Fidler, 1951. Cité par Lejeune, 1960.

Flanzy M., 1946. L'indice de tartre dans les vins. Signification météorique. *Ann. agron.*, **16**, 341.

Flanzy C., André P., 1965. Note sur le métabolisme des raisins en situation d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **14**, n° 2, 173-178.

Flanzy C., André P., Flanzy M., Chambroy Y., 1967. Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. I. Influence de la température. *Ann. Technol. agric.* (à paraître).

Frutton J. S., Simmonds S., 1958. *General Biochemistry* p. 834, 2e Ed. John Wiley and Sons. New York.

Garino-Canina., 1948. (Fermentation vinaire avec des détails biochimiques du processus de la fermentation du moût de raisin). *Bull. Off. internation. Vigne Vin*, **204**, 55-61.

Hartmann, 1962. La décarboxylation du pyruvate par les tissus de Poire au cours de la maturation du fruit. *Rev. gén. Bot.*, **69**, 26-31.

Hulme A. C., 1956. Dégâts du CO_2 et présence d'acide succinique dans les pommes. *Nature*, **186**, 218-219.

Hulme A. C., 1958. Quinic and shikimic acids in fruits. *Qual. Plant. et Materiae veg.*, 468-473.

Hulme A. C., 1959. Cité par Smith W. H., 1963. The use of carbondioxide in the transport and storage of fruits and vegetables. *Adv. Food Res.*, **12**, 121.

Hulme A. C., 1962. Cité par Clijsters, 1965.

Hulme A. C., 1964. Évolution biochimique après la récolte et leur importance dans le stockage des pommes. *Le potassium et la qualité des produits agricoles.*

Hulme A. C., Smith, Wooltorton., 1964. Évolution biochimique associée au développement du cœur brun à basse température dans les pommes. *J. Sci. Food and Agric.*, **15**. n° 5, 303.

Jolivet E., 1963. L'action de la « rinolite » sur l'évolution des acides organiques dans diverses parties du tubercule de pomme de terre. *C. R. Acad. Sci.*, **257**, 747-750.

Lafon M., 1959. Sur les réactions de formation de l'acide acétique, de l'acide succinique et du 2-3 butanediol dans la fermentation alcoolique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **41**, 503.

Lejeune, 1960. Sur la cinétique de production d'alcool au cours de la fermentation propre des grains de blé. *C. R. Acad. Sci.*, **251**, 2081-2082.

Martin S. M., 1955. A spray reagent for identification of organic acids . *Chem. and Industry*, avril, 427-428.

Mayer K., Busch I., Pause G., 1964. Über die Bernsteinsäurebildung Während der Weingärung. *Z. Lebensmittel.- Unters. u. Forsch.*, 125-375.

Meyerhardt J. T., 1965. Biosynthesis of dicarboxylic acids through carbon dioxide fixation by an enzyme extract from Burbürker grapeberries. *S. Afr. J. agric. Sci.*, **8**, 381-392.

Neal, Hulme A. C., 1958. The organic acid metabolism of Bramley's seedling apple peel. *J. exper. Bot.*, **9**, 142-157.

Ournac A., 1952. Recherches sur la maturation artificielle du raisin. *Ann. Technol. agric.*, n° 1,85-106.

Panteleev A. N., Kljusheva L. N., 1966. La question du métabolisme de l'acide tartrique chez des plantes supérieures. *Vest. Leningrad. Univ.*, **3**, 123-129.

Paskova J., Munk V., 1960. *J. Chromatogr.* **4**, 241-243.

Peynaud E., Guimberteau G., 1962. Modification de la composition des raisins au cours de leur fermentation propre en anaérobiose. *Ann. Physiol. vég.*, **4**, n° 2, 161-167.

Ranson, 1953.. Zymase et métabolisme des acides chez les plantes supérieures. *Nature.*, 252.

Rygs, Wells, 1962. Cités par Smith W. H., 1963.

Roux L., Lesaint Mme C., 1959. Mise au point d'une technique de détermination des acides organiques chez les végétaux. *Ann. Physiol. vég.*, n° 1, 83-92.

Thoukis B., Ueda M., Wright D., 1965. The formation of succinic acid during alcoholic fermentation. *Amer. J. Œnol. and Vitic.*, **16**, n° 1.

Ulrich R., 1952. *La vie des fruits.* p. 187 et 250, Masson, Paris.

Ulrich R., Landry Mme J., 1956. Formation d'acides organiques dans les fruits conservés en atmosphère riche en gaz carbonique. *C. R. Acad. Sci.*, 2757-2759.

Williams M. W., Patterson M. E., 1964. Non-volatile organic acids and core breakdown of *Bartlett* Pears. *Agric. and Food Chem.*, **12**, n° 1, 80-83.

Young R. E., Biale J. B., 1956. Cité par Williams-Patterson 1964, 83.

Young R. E., Cité par Smith W. H., 1963.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (2), 109-116.

MÉTHODE DE VINIFICATION PAR MACÉRATION CARBONIQUE (1)

I. — Production de jus de goutte en vinification par macération carbonique

P. ANDRÉ, P. BÉNARD, Y. CHAMBROY, C. FLANZY, C. JOURET

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est, 84 - Montfavet ;
Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne ;
Station d'Agronomie et d'Œnologie, Section Technologie, 31 - Toulouse
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Les auteurs étudient le comportement des raisins non foulés précipités dans les cuves de vinification. Dans ces conditions des grains éclatent. Ils sont ainsi exclus des phénomènes biochimiques qui peuvent se passer dans le grain non éclaté. La proportion de ces raisins est indéterminée. Les auteurs se sont efforcés de la préciser.

INTRODUCTION

Dans la technique de vinification dite « Macération Carbonique » un volume jusqu'à présent non précisé des raisins est involontairement écrasé, en partie dès son introduction par un effet de choc, en partie par l'éclatement du grain sous l'action de la pression exercée de haut en bas par une masse suffisante de raisins.

Le volume écrasé en plus des phénomènes de macération subit la fermentation alcoolique banale. La cuve est très rapidement saturée de CO_2, une fraction de ce

(1) Cette méthode, couramment utilisée dans plusieurss grandes régions viticoles. pose de nombreux problèmes tant sur le plan technologique que sur le plan biochimique. Les travaux réalisés en cave, parallèlement à des recherches effectuées en laboratoire, tendent à élucider ces problèmes et à proposer des règles de conduite pour de telles vinifications.

Des essais menés depuis 1959 au Domaine expérimental de Pech-Rouge ont permis de dégager certains résultats qui feront l'objet d'une série de publications.

gaz provenant de cette fermentation alcoolique, une autre fraction provenant de la respiration du raisin entier qui se traduit par une absorption d'oxygène et un dégagement de CO_2.

Les raisins se trouvent alors dans les conditions suivantes :

— au niveau inférieur : raisins écrasés depuis le temps 0 (temps d'introduction), on retrouve ainsi les caractéristiques d'une vinification classique ;

— au-dessus : raisins non foulés baignant dans du moût [1] en fermentation ;

— au niveau supérieur : raisins non foulés, en atmosphère CO_2.

Les conditions rencontrées dans le haut de la cuve sont analogues à celles des fruits en atmosphère CO_2. Ainsi, la part revenant à la « macération carbonique » dans le produit final sera d'autant plus importante que la masse des raisins écrasés sera faible. Il est essentiel, pour la pratique de ce mode de vinification, d'avoir sur « cet écrasement » des données précises. Dans ce but les travaux s'échelonnent de 1960 à 1965 inclus, avec des objectifs bien définis d'année en année.

TECHNIQUES ET PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

L'écrasement du grain provoque l'écoulement du jus. C'est par la mesure du liquide écoulé que l'on apprécie la masse des grains éclatés. Pour cela on confronte ce volume au volume total : jus de goutte + jus de presse, obtenu au moment du décuvage et au pressurage. Ce rapport donne la proportion de grains éclatés.

Au cours des années 1960 à 1964 on a noté comparativement les quantités de jus de goutte obtenus, avec des raisins non foulés soumis à la « macération carbonique », avec des vendanges foulées et avec des vendanges éraflées ; ces dernières étant vinifiées d'une façon classique.

En 1965 deux séries d'essais A et B ont été mises en train, pour suivre spécialement la cinétique de production de jus en macération carbonique. Dans la série A, sont comparées : une cuve de macération carbonique classique avec contact moût-vendange (C_3) et deux cuves de macération carbonique où le moût est séparé de la vendange (C_1 et C_2). La série B comporte une cuve témoin de vinification en vendange foulée (C_4) et deux cuves vinifiées en macération carbonique : la cuve C_5 subit un remontage quotidien à l'abri de l'air. (Ce dernier essai se justifie par le fait que certains praticiens estiment bénéfiques les remontages effectués sur des cuves de macération carbonique). La cuve C_6 correspond au point de vue expérimental à la cuve C_3 de la série A.

La distribution des différents lots de raisin se fait suivant la technique de BENARD-JOURET (1963).

Le tableau 1 rassemble les caractéristiques des différents essais 1965.

Les températures données par le tableau 1 correspondent aux températures extrêmes atteintes durant la vinification et non pas nécessairement à celles de début et de fin de cuvage.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Rendements comparés en jus de goutte pour divers types de vinification.

Au cours d'essais réalisés de 1960 à 1964 nous avons trouvé que la proportion du moût de goutte par rapport au moût total (moût de goutte + moût de presse) varie :

Pour la macération carbonique.....	de 63 à 74 p. 100
Pour la vendange foulée	de 82 à 88 —
Pour la vendange éraflée.....	de 83 à 90 —

[1] Dans le texte, les termes moûts et jus sont employés indifféremment.

TABLEAU I

Expérimentation 1965

Série	N° cuve	Capacité (hl)	Surface du fond (m^2)	Poids vendange (kg)	Méthode de vinification	T °C cuves	T °C moût	Dispositif expérimental
A	C_1	110	4,55	4 700	Macération CO_2	21 à 23,3		Clayonnage au-dessus du fond de la cuve. Écoulement moût en continu.
	C_2	110	4.55	4 700	Sans contact moût vendange	22,2 à 24,4	19,2 à 25,6	Clayonnage. Écoulement moût 3 fois par jour.
	C_3	110	4,55	4 700	Macération CO_2	23,8 à 28		
B	C_4	110	4,55	7 500	Vendange foulée	22,4 à 32,2	21,2 à 32,2	
	C_5	180	7,20	7 500	Macération CO_2 avec remontage	21 à 26,4	20,5 à 25,1	Remontage quotidien sous CO_2.
	C_6	180	7,20	7 500	Macération CO_2	21,6 à 27,1	19,3 à 25,3	

TABLEAU 2

Quantités respectives de vin de goutte et de vin de presse

Année	Cépage (%)	Méthode de vinification	Surface base cuve	Quantité moût goutte en hl	Quantité de moût total	Quantité moût presse en hl	Pourcentage Moût goutte / Moût total
1960	*Carignan rouge* ..... 27 *Carignan blanc* 47	Macération carbonique	4,55	34	49	15	69
	Terret blanc ..... 22,5 *Aramon + Listan* 3,5	Macération ordinaire	4,55	45	55	10	82
1962	*Carignan noir* ..... 15 *Carignan blanc* 35	Macération carbonique	4,55	29,5	41,5	12	71
	Clairette 41	Macération ordinaire	4,55	35	42	7	83
	Terret ..... 3,5 *Cinsault* 6,5	Vendange éraflée	4,55	38	43	5	88

Les moyennes s'établissent à 76 p. 100 pour la macération carbonique, 83 p. 100 pour la vendange foulée, 84 p. 100 pour la vendange éraflée.

On retrouve sensiblement les mêmes chiffres dans des essais portant sur différents cépages (tableau 2).

Cinétique de la production de jus de goutte en macération carbonique.

La vitesse d'écoulement du jus, pendant la durée de l'expérience, a été rapportée dans le tableau 3 en calculant les litres recueillis à l'heure. Les cuves C_1 et C_2 ayant eu une évolution identique, nous n'avons noté ici que les résultats de la cuve C_2.

TABLEAU 3

Cinétique de la production de jus de goutte dans la cuve C_2

Date (jour)	Heure	Quantité de jus écoulé en 1 heure	Date (jour)	Heure	Quantité de jus écoulé en 1 heure
0	11		7	5 13 21	9,15 7,75 7,30
1	5 12 21	8 8 9,50	8	5 13 21	6,60 6,25 5,85
2	5 13 21	7,10 6,30 7,60	9	5 13 21	5,25 5,20 4,65
3	5 13 21	8,10 9,90 10,90	10	5 13 21	4,80 4,10 4,00
4	5 13 21	11,40 13,70 13,20	11	5 13 21	4,45 3,40 3,35
5	5 13 21	14,70 12,90*i* 13,10	12	5 13 21	3,05 2,70 2,95
6	5 13 21	11,45 11,05 9,25	13	5 13 21	2,30 1,50

A partir de ces données nous avons construit 2 courbes complémentaires, traduisant la cinétique d'écrasement des baies :

— la courbe 1 figure le volume total de jus de goutte p. 100 du jus total (presse + goutte) à un jour donné de l'expérimentation ;

— la courbe 2 représente le volume de jus de goutte écoulé quotidiennement p. 100 du jus total.

L'évolution de la pente de la courbe 1, l'allure de la courbe 2, et l'examen du tableau 3 montrent que :

A la fin des premières 24 heures, on enregistre le volume de jus libéré lors de l'encuvage par l'écrasement des baies au fond de la cuve et leur tassement initial.

Au 2e jour, on note une légère diminution de la vitesse d'écoulement suivie d'une remontée avec un maximum vers le 5e jour. La vitesse diminue ensuite jusqu'au décuvage.

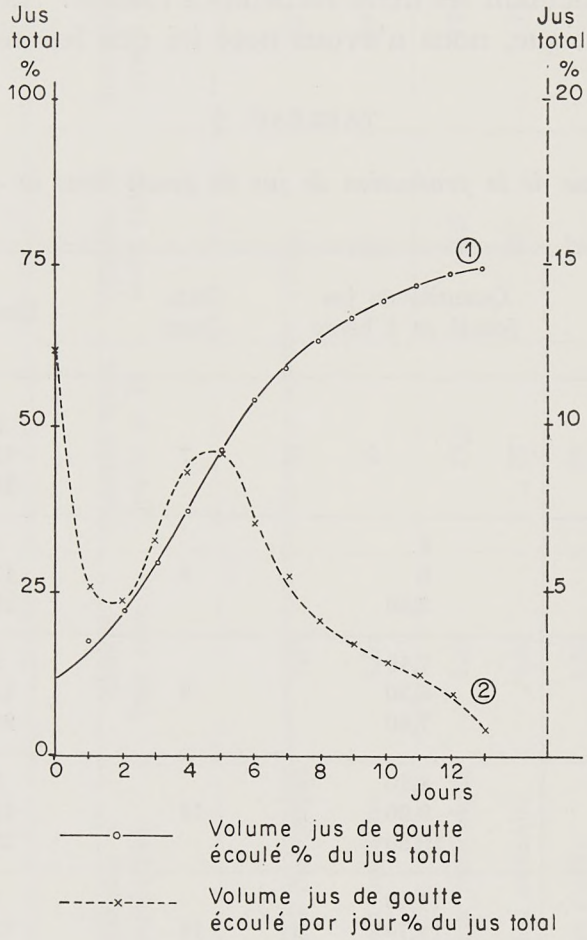


FIG. 1.

Influence de certains procédés sur la production de jus de goutte en macération carbonique

L'essai A — 1965) nous a permis de contrôler que le soutirage continu ou triquotidien du jus de goutte ne modifie pratiquement pas la quantité totale de ce jus :

C_1 : 2 750 l ;
C_2 : 2 768 l ;
C_3 : 2 780 l.

Les variations du rapport jus de goutte/p. 100 du jus total, qui en découlent, sont faibles (tabl. 4).

L'essai B — 1965) montre (tabl. 4) que les remontages au cours de la macération carbonique (C_5) augmentent le volume de jus de goutte par rapport au jus total. Ce volume correspond sensiblement à celui obtenu par vinification en vendange foulée (C_4).

Ce rendement maximum de la cuve C_5 ne provient pas du fait que la température était plus élevée lors de l'essai B, mais uniquement de l'effet remontage, C_5 et C_6 étant sensiblement comparables au point de vue température de fermentation. Pression du jus et dépression par soutirage ont dû produire un effet d'écrasement.

TABLEAU 4

Proportions respectives de jus de goutte p. 100 du jus total

	Essai A			Essai B		
	Macération carbonique			Macération carbonique		Foulage
	C_1 (%)	C_2 (%)	C_3 (%)	C_5 (%)	C_6 (%)	C_4 (%)
24 heures	15,9	17,8				
7 jours	52,5	59,8				
12 jours	71,5	73,6	70,6	84,7	73,8	82

CONCLUSION

Ces essais ont permis de préciser la proportion de jus qui peut bénéficier totalement de la « macération carbonique » au cours de la vinification par cette technique.

Il est logique, en effet, d'admettre :

— que le jus obtenu par écrasement du raisin lors du remplissage ne subit qu'une fermentation alcoolique classique. Dans nos essais, cette quantité représente 17 à 20 p. 100 du jus total ;

— que le jus obtenu par pressurage, après le décuvage, dans nos cuves à écoulement constant, a participé pleinement au phénomène de la macération carbonique. Dans nos essais, cela représente 20 à 25 p. 100 du jus total.

Le solde du jus (55 à 63 p. 100) subit donc les deux métabolismes dans l'ordre : macération carbonique et fermentation alcoolique.

Le « remontage » du jus au cours de la vinification « macération carbonique » accroît sensiblement le volume du jus de goutte. L'éclatement correspondant des grains de raisin peut s'expliquer par le frottement continu du liquide sur la paroi du grain, frottement d'autant plus actif que la pellicule subit une modification de structure au cours de la « macération ».

Il en résulte que l'on soustrait ainsi à l'action de la macération carbonique une masse non négligeable de raisins. Si donc on recherche un effet maximum de ce mode de vinification le remontage doit être évité.

Reçu pour publication en décembre 1966.

SUMMARY

ON THE METHOD OF WINE-MAKING BY CARBONIC MACERATION.

I. — PRODUCTION OF GRAPE JUICE IN WINE-MAKING BY CARBONIC MACERATION

This work describes the proportion of treated grapes undergoing fermentation during wine-making by carbonic maceration.

The practice of mixing the vat contents by pumping or mechanical stirring (remontage) in this type of wine-making increases the quantity of the juice.

RESUMEN

MÉTODO DE VINIFICACIÓN POR MACERACIÓN CARBÓNICA

I. — PRODUCCIÓN DEL ZUMO DE GOTA EN VINIFICACIÓN POR MACERACIÓN CARBÓNICA

En este trabajo se precisa la proporción de vendimia que queda sometida a la fermentación intracelular durante el transcurso de la vinificación por maceración carbónica.

La práctica de la añadición de mosto en este género de vinificación incrementa la cantidad de zumo de gota.

RIASSUNTO

SUL METODO DI VINIFICAZIONE CON MACERAZIONE CARBONICA

I. — PRODUZIONE DI MOSTO DI SGRONDATURA NELLA VINIFICAZIONE CON MACERAZIONE CARBONICA

Questo lavoro precisa la proporzione di vendemmia che subisce la fermentazione intracellulare nel corso della vinificazione con macerazione carbonica.

La pratica del rimontaggio in questo tipo di vinificazione accresce la quantita di mosto di sgrondatura.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BÉNARD P., JOURET C., 1963. Essais comparatifs de vinification en rouge, *Ann. Technol. agric.*, **12** (2), 85-102.

FLANZY C., ANDRÉ P., 1965. Note sur le métabolisme des raisins en situation d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.* **14** (2), 173-178.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (2), 117-123.

MÉTHODE DE VINIFICATION PAR MACÉRATION CARBONIQUE

II. — La production d'alcool en vinification par macération carbonique

P. ANDRÉ, P. BÉNARD, Y. CHAMBROY, C. FLANZY, C. JOURET

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est, 84 - Montfavet;
Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne;
Station d'Agronomie et d'Œnologie, Section Technologie, 31 - Toulouse;
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Les auteurs ont essayé de voir si, en première approximation et dans la pratique de la vinification dite « Macération Carbonique », la production d'alcool et la cinétique de production étaient identiques ou différentes de la production d'alcool dans une vinification classique de raisins foulés.

Si le rendement alcoolique est sensiblement le même dans les deux types de vinification, la vitesse de formation d'alcool est plus lente et plus régulière en macération carbonique.

INTRODUCTION

En vinification par « Macération Carbonique » on se trouve en présence de deux phénomènes qu'on ne peut pour l'instant supposer identiques, d'une part la fermentation alcoolique du moût [1] de raisin sous l'action des levures alcooliques, d'autre part l'ensemble des métabolismes subis par un grain de raisin entier placé en atmosphère carbonique. Enfin, pour le praticien il est essentiel de savoir si, finalement, la production d'alcool peut distinguer le mode de vinification « Macération Carbonique » des modes de vinification classiques.

[1] Dans le texte, les termes moût et jus sont employés indifféremment.

TECHNIQUE ET PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Matériel et matériaux sont ceux qui ont été utilisés dans les essais de 1965 faisant l'objet du mémoire : « Recherches sur la production du jus de goutte en vinification par « Macération Carbonique ».

On a donc en train deux séries de cuves : les cuves 1, 2, 3 (série A) et les cuves 4, 5, 6 (série B).

La production d'alcool a été suivie :

a) dans les cuves C_1 et C_6 par la mesure du CO_2 dégagé, mesure justifiée par la correspondance CO_2-alcool éthylique dans la fermentation par la levure et la fermentation intracellulaire (C., FLANZY P., ANDRÉ 1965)

A cet effet, on a disposé un compteur à gaz à la sortie de la cuve (photo 1) précédé d'un système de réfrigération pour les vapeurs condensables à températures relativement basses (+ 10°C).

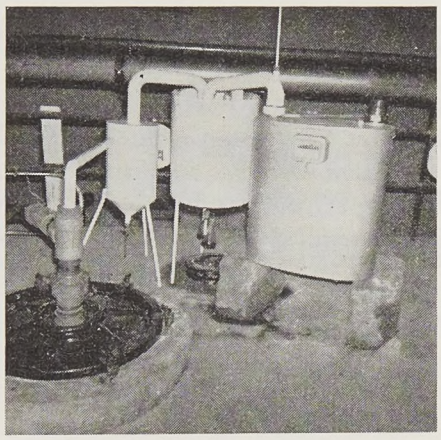


FIG. 1.

b) dans les cuves C_2, C_4 et C_5 par la mesure du degré acquis par dosage selon la méthode chimique (FLANZY et *al.*, 1955).

Le dégagement de gaz carbonique provient de la fermentation alcoolique du jus écoulé et des métabolismes dont les grains non éclatés sont le siège ; ceci dans l'hypothèse où du CO_2 produit émigrerait à l'extérieur du grain, après saturation du grain.

Par ailleurs, des essais qui seront relatés dans un autre mémoire nous montrent qu'en première approximation, le rendement Sucre-CO_2 est le même aussi bien dans le grain entier en état d'anaérobiose, qu'en fermentation alcoolique banale. Par mesure du CO_2 on détermine ainsi approximativement l'état fermentaire global de la cuve. La correspondance entre le p. 100 d'alcool formé au décuvage de C_6 et celui calculé à partir du CO_2 dégagé (92,2 p. 100 et 91,8 p. 100) prouve la validité de cette méthode de mesure.

Dans l'étude cinétique de la production d'alcool, les résultats ont été calculés en litres d'alcool ; ceux-ci sont exprimés par rapport à la quantité totale de métabolite formé (alcool ou CO_2 suivant le cas) et en puissance (sucres résiduels) à la fin de la fermentation.

RÉSULTATS — DISCUSSION

Comparaison du rendement alcoolique en vinification par vendange foulée et en vinification par macération carbonique

L'essai B 1965 nous a permis de comparer les rendements alcooliques obtenus par ces deux types de vinification. La cuve C_4 a été vinifiée en vendange foulée, les cuves C_5 et C_6 en macération carbonique.

— Les mesures d'alcool acquis et de sucres résiduaires ont été réalisées sur 3 sortes d'échantillons :

1. au décuvage sur les vins de presse et de goutte de chaque cuve ;

2. sur les vins de presse et de goutte dont la vinification a été conduite séparément en bonbonnes de 4 l.

3. sur les mélanges de vins de presse et de goutte, dont la fermentation commune s'est produite en cuves de 110 hl.

Dans le tableau 1 nous avons représenté les caractéristiques des différents vins. Nous avons calculé l'alcool théorique des mélanges de presse et goutte (compte tenu des sucres résiduaires lorsque ceux-ci dépassent 3 g/1) pour les échantillons 1 et 2.

Nous voyons que les degrés alcooliques atteints dans les mélanges à l'échantillonnage final 3, sont sensiblement les mêmes. La cuve 6 présente cependant un degré légèrement inférieur ($0^0 15$,) à celui des deux autres. Il est possible que cette différence soit due à une perte d'alcool lors du 1er soutirage : cette opération a été effectuée à des jours différents pour les trois cuves et la température extérieure a varié fortement durant cette période. Cette explication est d'autant plus plausible que le degré théorique calculé pour la somme vins presse + goutte vinifiés séparément (échantillonnage 2) est nettement supérieur au degré du mélange réel (échantillonnage 3) : $11^0 48$, contre $11^0 25$,.

Ces résultats rejoignent ceux que l'on peut obtenir à partir des travaux de Bénard-Jouret (1963). Si, sur les 3 séries d'essais comparant vendange éraflée, vendange foulée et raisins entiers, on calcule l'alcool du mélange théorique vins goutte + presse, on constate que :

1. dans tous les cas, le vin de vendange éraflée a un degré alcoolique supérieur à ceux des deux autres ;

2. dans deux essais, le vin de vendange foulée présente $0^0 09$, et $0^0 18$, d'alcool de plus que le vin de macération carbonique ;

3. dans un cas, le vin de macération carbonique a un titre alcoolique plus élevé de $0^0 07$, par rapport à celui de vendange foulée.

Ce rendement alcoolique semble donc peu différent en vinification par vendange foulée et par macération carbonique.

La faible diminution de degré alcoolique que l'on peut rencontrer en macération carbonique par rapport à la vinification en vendange foulée est difficilement explicable. En effet, des travaux personnels (André-Flanzy non publiés) confirmés partiellement par d'autres auteurs ((Chauvet et *al.*, 1965) paraissent montrer que le rendement alcoolique de la fermentation intracellulaire (phénomène original utilisé dans la macération carbonique) est au moins identique sinon supérieur au rendement moyen de 17 g de sucres pour 1^0 d'alcool. Dans ces conditions, il est peu probable que la première phase de vinification par macération carbonique conduise à des « Jus » dont le degré en puissance soit inférieur à celui des vins correspondants de vendange foulée. Nos essais 1965 montrent d'ailleurs, lors du 1er échantillonnage, des teneurs d'alcool en puissance plus élevées en macération carbonique qu'en vendange foulée (ceci peut s'expliquer si l'on suppose une transformation en alcool de certains métabolites autres que le sucre). Les pertes d'alcool en Macération Carbo-

TABLEAU I

Rendements en alcool

Cuve		4			5			6		
Rendement kg/hl limités T °C		118 22,4 à 32,2			115 20,5 à 2,51			115 19,3 à 25,3		
		Goutte	Presse	Mélange	Goutte	Presse	Mélange	Goutte	Presse	Mélange
Volume (l)		5 200	1 150	6 350	5 520	1 000	6 520	4 800	1 700	6 500
Échantillons I	Alcool (°GL)	10,72	10,98		11,32	10,66		10,98	10,08	
	Sucres (g/l)	10,3	10,7		2,5	31,2		5,75	64,4	
	Puissance (°GL)	11,29	11,57	11,34	11,45	12,42	11,59	11,30	12,65	11,65
Échantillons II	Alcool (°GL)	11,40	11,30		11,15	12,35		11,05	12,70	
	Sucres (g/l)	2,36	2,27	11,38	1,88	1,49	11,33	2,16	1,46	11,48
Échantillons III	Alcool (°GL)			11,40			11,40			11,25
	Sucres (g/l)			2,11			1,84			1,62
	d			995,3			994,4			994,8
	AV (g/l)			0,23			0,23			0,23

nique, si pertes il y a, se produiraient donc dans la 2e phase de vinification, lorsque les jus de goutte et de presse sont mélangés et qu'une fermentation alcoolique rapide (souvent accompagnée de la fermentation malolactique) achève l'élaboration du vin.

Quoiqu'il en soit, cette perte, en admettant qu'elle existe, est de l'ordre de grandeur de celles enregistrées lors de manipulations des vins à températures relativement élevées. Comme, le plus souvent les vins obtenus par macération carbonique sont plus fins que leurs homologues de vendange foulée, une plus-value leur est accordée et l'incidence économique d'un degré légèrement inférieur est ainsi annulée.

Cinétique de la production d'alcool

Les résultats sont représentés sur la figure 2 pour les cuves C_4, C_5, C_6 de la série B et C_1 de la série A.

— Si l'on considère les cuves 4 et 6, on constate que la pente de la courbe représentative de C_4 est bien supérieure à celle de C_6. Autrement dit, la vitesse de fermentation est plus élevée dans la cuve 4 que dans la cuve 6.

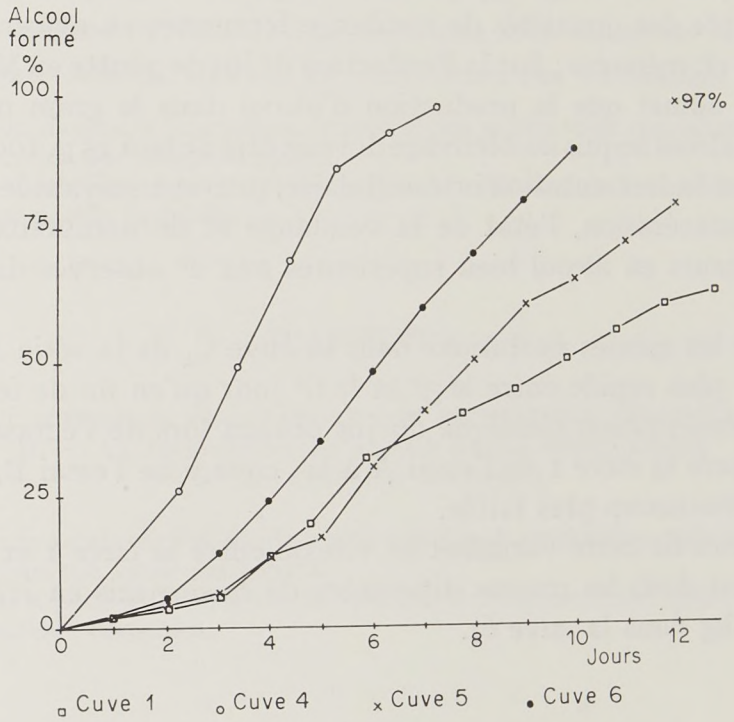


Fig 2.

Cette différence de vitesse est extrêmement importante car elle nous explique une des raisons de succès de la méthode Macération Carbonique : la vitesse de fermentation est plus régulière. Une conséquence importante en découle : la production régulière de calories est non « explosive » comme dans le cas de fermentation alcoolique par les levures d'où des températures plus basses.

On peut voir les raisons de cette différence sur la figure 2 en examinant la courbe de la cuve 5.

Cette courbe a été obtenue de la façon suivante : nous avons chaque jour déterminé le degré du jus du fond et mesuré la quantité de ce jus. Nous en avons déduit la quantité d'alcool formé dans ce jus et nous l'avons exprimée sur la figure 2 en pourcentage par rapport à l'alcool total existant et en puissance au décuvage.

L'alcool ainsi comptabilisé ne tient pas compte de l'alcool des baies et ne représente donc que l'alcool d'une fermentation classique. On peut noter que cette fermentation est également un phénomène linéaire et ceci est vraisemblablement dû à la libération journalière de jus provenant des grains éclatés. Ce phénomène nous explique la régularité de la fermentation dans le cas d'une cuve de macération carbonique.

Si la cuve 5 paraît plus paresseuse que la cuve 6, alors que son rendement en jus de goutte final est plus élevé, cela tient au mode de prélèvement du moût en cours de vinification. En effet, la quantité quotidienne de jus de goutte a été mesurée après une saignée de 2 heures ; mais des poches de liquide se sont formées au sein de la masse de vendange et le volume ainsi retenu n'a pu être comptabilisé qu'au jour du décuvage. La courbe réelle représentative de C_5 est donc, en réalité une courbe parallèle à celle représentée et épousant pratiquement la courbe de C_6.

Sur le même graphique, nous avons noté le pourcentage d'alcool acquis total (goutte + presse) au décuvage (97 p. 100). Ce pourcentage peut étonner. En effet, si l'on tient compte des quantités de vendange fermentée en macération carbonique (30 à 40 p. 100 — cf. mémoire : Sur la Production de jus de goutte en Macération Carbonique) et si l'on admet que la production d'alcool dans le grain macéré est de 2°, le pourcentage d'alcool acquis au décuvage devrait être de 60 à 75 p. 100 seulement. Mais les baies subissant la fermentation intracellulaire, peuvent suivant le type de cuves, la température de macération, l'état de la vendange et de nombreux autres facteurs atteindre des teneurs en alcool bien supérieures aux 2° observés dans des essais en laboratoire.

On retrouve les mêmes évolutions dans la cuve C_1 de la série A. La vitesse de fermentation est plus rapide entre le 3e et le 6e jour qu'en fin de fermentation. Ceci provient de la fermentation classique du jus obtenu lors de l'écrasement.

Si l'on compare la cuve 1 de l'essai A à la cuve 6 de l'essai B, on a une vitesse de fermentation beaucoup plus faible.

Une des causes de cette variation de vitesse entre la cuve 1 et la cuve 6 réside vraisemblablement dans les masses différentes de raisins mis en jeu (4 700 kg dans la cuve 1, 7 500 kg dans la cuve 6).

CONCLUSION

La production globale d'alcool est sensiblement la même, aussi bien avec la mise en œuvre de raisins foulés qu'avec des raisins non foulés. La vinification par « Macération Carbonique » ne peut donc être invoquée comme une technique susceptible de provoquer une diminution de degré alcoolique.

La cinétique de formation est différente de celle qui est notée dans une vinification avec raisins foulés. Quelles que soient les modalités de cette formation, leur

résultante aboutit à une fermentation plus modérée et régulière, ce qui conduit à une diminution sensible de la température de fermentation.

D'autres conséquences, comme la diffusion des anthocyanes, aussi importantes sur le plan technologique que sur le plan biologique, feront l'objet de prochaines publications.

Reçu pour publication en décembre 1966.

SUMMARY

ON THE METHOD OF WINE-MAKING BY CARBONIC MACERATION

II. — PRODUCTION OF ALCOHOL IN WINE-MAKING BY CARBONIC MACERATION

Alcohol production and the kinetics of production are compared for carbonic maceration and wine-making by grape treading.

The alcohol yield is very little different, but the speed of alcohol formation is slower and more regular in carbonic maceration.

RESUMEN

MÉTODO DE VINIFICACIÓN POR MACERACIÓN CARBÓNICA

II. — LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL EN VINIFICACIÓN POR MACERACIÓN CARBÓNICA

La producción de alcohol y su cinética de producción es objeto de comparación en maceración carbónica y en vinificación por vendimia pisada.

El rendimiento alcohólico es poco diferente, pero la velocidad de formación de alcohol se más lenta y regular en maceración carbónica.

RIASSUNTO

SUL METODO DI VINIFICAZIONE CON MACERAZIONE CARBONICA
II. — LA PRODUZIONE DI ALCOLE NELLA VINIFICAZIONE
CON MACERAZIONE CARBONICA

Sono paragonate le produzioni di alcole e loro velocita di produzione nella macerazione carbonica e nella vinificazione con vendemia pigiata.

Il ricavo alcolico e poco differente ma la velocita di formazione del alcole e più lenta e più regolare nella macerazione carbonica.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bénard P., Jouret C., 1963. Essais comparatifs de vinification en rouge. *Ann. Technol. agric.* **12**, (2), 85-102.

Chauvet J., Bréchot P., Croson M. Mme, Irrmann R. 1965. Croissance anaérobie des levures au cours de vinification par macération de vendanges entières. I. T. V. 10e Colloque œnologique, Montpellier.

Flanzy M., Bouzigues L. Mme, Bouzigues H., 1955. La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange suifochromique. *Ann. Technol. agric.* **4**, 397-415.

Flanzy C., André P., 1965. Note sur le métabolisme des raisins en situation s'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **14**, (2), 173-178.

Flanzy C., André P., Flanzy M., Chambroy Y., 1967. Variation quantitative des acides organiques stables non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. I. — Influence de la température.II. — Influence de la durée d'anérobiose. *Ann. Technol. agric.* **16** (2), 89-107.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (2), 125-134.

ÉTUDE DE L'INHIBITION DE LA RESPIRATION DE L'ACIDE L-LACTIQUE PAR L'ACIDE OXALIQUE CHEZ CERTAINS MUTANTS « COLONIES LISSES » DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* HANSEN

C. BIZEAU

avec la collaboration technique d'Émilienne BIZEAU

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Génétique,
Centre de Recherches agronomiques du Midi,
École nationale supérieure agronomique, 34 - Montpellier
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

L'influence de l'acide oxalique sur la respiration de l'acide L-lactique a été étudiée sur deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. Les lois d'action de la concentration en acide L-lactique sur la vitesse de respiration de ce substrat sont différentes pour les deux souches en absence d'acide oxalique. Elles deviennent très voisines en présence de cet inhibiteur. Ce phénomène est difficile à interpréter, car l'acide oxalique a une action inhibitrice générale sur la respiration de la cellule intacte.

INTRODUCTION

La souche 183 de *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN a été obtenue par croisement de deux mutants « colonies lisses » sélectionnés par culture prolongée sur acide lactique. Elle respire l'isomère L de cet acide selon une loi différente de celle qui existe chez les souches à phénotype plissé, comme la souche 4.

Chez la souche sauvage, la vitesse de respiration de l'acide L-lactique mesurée à pH 4,5 varie en fonction de la concentration comme varierait la vitesse de réduction de cet acide par la L-lacticocytochrome C réductase *in vitro*. La respiration de l'acide L-lactique par la souche mutante suit une loi différente, et telle que le système respiratoire de la souche mutante présente une constante apparente de demi-

saturation 5 à 10 fois plus faible que celle de la souche sauvage (GALZY, 1964).

La mutation ne modifie pas le K_m de la L-lacticocytochrome C réductase mesuré sur des broyats, ni probablement le mécanisme d'entrée de l'acide L-lactique dans la cellule (GALZY 1964). Il serait intéressant de vérifier si elle ne modifie pas le K_m de l'enzyme *in situ* par exemple en modifiant sa liaison avec les structures de la cellule.

SLONIMSKI et LABEYRIE (1964) ont montré que l'acide oxalique inhibe compétitivement la L-lacticocytochrome C réductase *in vitro*, avec un K_i d'environ 1 mM. L'acide oxalique n'étant pas un métabolite pour la levure, on peut l'utiliser pour l'étude de la respiration de l'acide L-lactique par la cellule intacte. Étant inhibiteur compétitif de la L-lacticocytochrome C réductase, il doit agir différemment sur les deux souches, si le site actif de l'enzyme est modifié dans la cellule intacte par la mutation, à condition toutefois qu'il parvienne jusqu'à l'enzyme. Selon CONWAY et DOWNEY (1950) l'acide oxalique pénètre très peu dans la cellule. Dans ces conditions il ne devrait agir que sur l'entrée de l'acide L-lactique.

La première partie de ce travail sera consacrée à l'étude succincte de l'entrée de l'acide oxalique dans la cellule chez les deux souches ; la deuxième partie, à l'action de l'acide oxalique sur la respiration de divers substrats ; la troisième, à la cinétique de l'inhibition par l'acide oxalique de la respiration de l'acide L-lactique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A — *Matériel biologique*

Le matériel biologique utilisé comprend les souches 4 et 183 (GALZY, 1964). Ces deux souches ne diffèrent que par un couple de gènes : la souche 4, de phénotype plissé, est PL_5 PL_5, la souche 183, de phénotype lisse, est pl_5/pl_5.

B — *Cultures*

Les cultures sont conduites sur milieu aéré contenant 0,5 p. 100 de *Yeast extract Difco* et 1 p. 100 d'éthanol, amené à pH 4,5 par de l'acide tartrique 10 p. 100.

C — *Mesure du volume cellulaire*

Le volume occupé par les cellules d'une suspension est apprécié par mesure du dépôt obtenu après centrifugation à 2 500 t/m, pendant 5 minutes. La matière vivante représente 75 p. 100 du volume de ce dépôt (CONVAY et DOWNEY, 1950).

D — *Dosages*

L'acide oxalique a été dosé par oxydation manganique après précipitation de l'acide oxalique sous forme d'oxalate de calcium.

L'acide lactique a été dosé par oxydation en éthanal par le sulfate cérique saturé à l'ébullition. L'oxydation doit être menée à pH 1,5-1,8 sur une prise ne contenant pas plus de 5 mg d'acide lactique. Le rendement d'oxydation est de 98 p. 100. L'éthanal formé est dosé selon JAULMES et ESPEZEL (1935).

E — *Mesure des vitesses de respiration*

Cette étude a été faite sur des suspensions non proliférantes, en tampon phosphate à pH 4,5, selon la méthode directe de Warburg.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

A — *Étude de la pénétration de l'acide oxalique*

L'étude par CONVAY et DOWNEY (1950) de la pénétration de différents substrats, a amené ces auteurs à conclure que l'acide oxalique ne pénétrait pas dans la levure, sauf dans une partie de la cellule qu'ils assimilent à la paroi glucidique et qui représente 10 p. 100 du volume. Il diffère en cela de l'acide acétique (KOTYK, 1960) qui pénètre librement sous forme non dissociée. Dans ce cas, la concentration intracellulaire est réglée par la différence existant entre le pH intracellulaire et le pH extracellulaire conformément aux deux équilibres résultants de la loi de Handerson Hasselbach :

$$(1)\ \text{pH interne} = \text{pK} + \log \frac{(\text{A})\ \text{interne}}{(\text{AH})}$$

$$(2)\ \text{pH externe} = \text{pK} + \log \frac{(\text{A})\ \text{externe}}{(\text{AH})}$$

Dans ces équations, (A) est la concentration en acide dissocié, (AH) la concentration en acide non dissocié. Celle-ci est égale à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule si les petites molécules AH diffusent librement.

Le mode d'entrée des acides lactiques L et D n'est pas connu.

Il a été vérifié, de façon rapide, que les conclusions de CONWAY et DOWNEY relatives à la non pénétration de l'acide oxalique, s'appliquaient également aux deux souches étudiées, dans des conditions voisines de celles dans lesquelles l'étude de la respiration de l'acide L-lactique était faite.

Le volume cellulaire occupé par l'acide oxalique a été mesuré de la façon suivante : à une solution d'acide oxalique, de concentration donnée, dans du tampon phosphate M/15 à pH 4,5, on ajoute une suspension de levure où le volume occupé par la matière vivante est connu. On laisse en présence 15 minutes en agitant, à la température ambiante, et on dose l'acide oxalique après élimination des levures par centrifugation. On peut ainsi calculer la quantité d'acide oxalique ayant pénétré dans les cellules et la concentration interne connaissant le volume occupé par celles-ci

Le graphique de la figure 1 porte en abscisse la concentration extérieure en acide oxalique, et, en ordonnée, la concentration interne correspondante en admettant que l'acide oxalique soit uniformément réparti dans l'espace intra-cellulaire. Chaque point du graphique représente la moyenne de 4 expériences. On peut considérer soit que l'acide oxalique est uniformément réparti dans la cellule, soit que le rapport de la concentration interne à la concentration externe exprime le pourcentage du volume cellulaire où l'acide oxalique pénètre librement. Dans cette seconde hypothèse la fraction du volume cellulaire ainsi occupée serait de 10 à 20 p. 100. On peut donc penser

avec CONWAY et DOWNEY que l'acide oxalique pénètre librement dans la partie la plus externe de la cellule, probablement la paroi glucidique.

Cependant, l'étude du métabolisme a montré que la respiration de la levure était modifiée par la présence d'acide oxalique même pour l'acide acétique qui pénètre

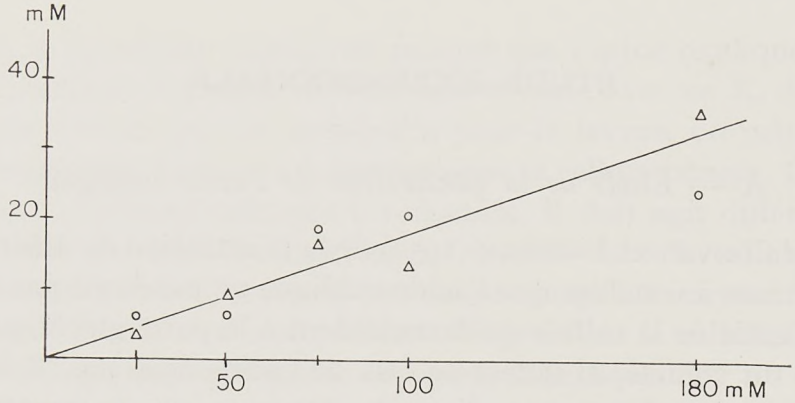


FIG. 1.— *Pénétration de l'acide oxalique dans les cellules de diverses suspensions des souches 4 et 183.*
Ordonnées : concentration externe mM.
Abscisses : concentration intracellulaire
○ Souche 4
△ Souche 183.

librement dans la cellule. L'acide oxalique doit donc pénétrer également au-delà de la membrane cytoplasmique.

Si l'on admettait l'hypothèse selon laquelle l'acide acétique ne pénètre plus librement en présence d'acide oxalique, il faudrait admettre également que cet acide est capable de modifier complètement les propriétés de la membrane cellulaire de telle sorte que la diffusion des petites molécules non dissociées ne puisse plus avoir lieu à travers elle.

En résumé, ces expériences ne montrent aucune différence entre les deux souches quant à la pénétration de l'acide oxalique, dans les conditions où nous avons opéré.

B — *Étude de la respiration de divers substrats par la cellule intacte en présence d'acide oxalique*

Les vitesses de respiration du glucose, de l'acide acétique, de l'acide pyruvique, des acides L et D lactiques ont été mesurées en présence et en absence d'acide oxalique sur un certain nombre de préparations correspondant chacune à une culture différente. Les résultats de ces comparaisons sont donnés par le tableau 1.

Les vitesses de respiration en présence d'acide oxalique sont exprimées en pourcentage de la vitesse de respiration du témoin sans acide oxalique. Les calculs ont été faits sur les valeurs brutes des vitesses de respiration, sans correction pour la respiration endogène. Il a été vérifié que celle-ci n'est pas modifiée par l'acide oxalique. L'acide oxalique à la concentration de 66 mM inhibe la respiration de tous les substrats étudiés, du moins dans le cas de la souche mutante. L'inhibition est particulièrement nette pour l'acide acétique et le glucose. Le système respiratoire de l'acide D-lactique est saturé lorsque la concentration de ce corps atteint 190 mM. Il en est de même pour l'acide pyruvique (BIZEAU et GALZY, 1965). A cette concen-

TABLEAU I

Respiration de divers substrats en présence d'acide oxalique 66 mM

Les vitesses de respiration sont données en pourcentage de la respiration des témoins sans acide oxalique (vitesses non corrigées pour la respiration endogène et calculées sur 0-15 minutes).

Substrat	Acide L-lactique	Acide D-lactique				Acide pyruvique				Glucose	Acide acétique
Concentration (mM) ..	76	190	76	19	7,6	190	76	19	76	3	38
Souche 4	80	99	99	26	55	106	106	90	88	44	33
Souche 183	47	96	67	35	—	108	48	79	79	21	12
Nombre de déterminations indépendantes.	8	2	4	2	7	1	4	3	3	4	3

tration l'acide oxalique 66 mM semble sans effet, mais il provoque une inhibition nette dans le cas de l'acide D-lactique, au-dessous de 76 mM pour la souche 183, et de 19 mM pour la souche 4.

Dans la gamme des concentrations étudiées, la respiration de l'acide pyruvique ne semble pas modifiée dans le cas de la souche 4. Elle l'est dans le cas de la souche 183 sauf pour la concentration saturante.

La respiration de l'acide L-lactique est nettement inhibée pour les deux souches.

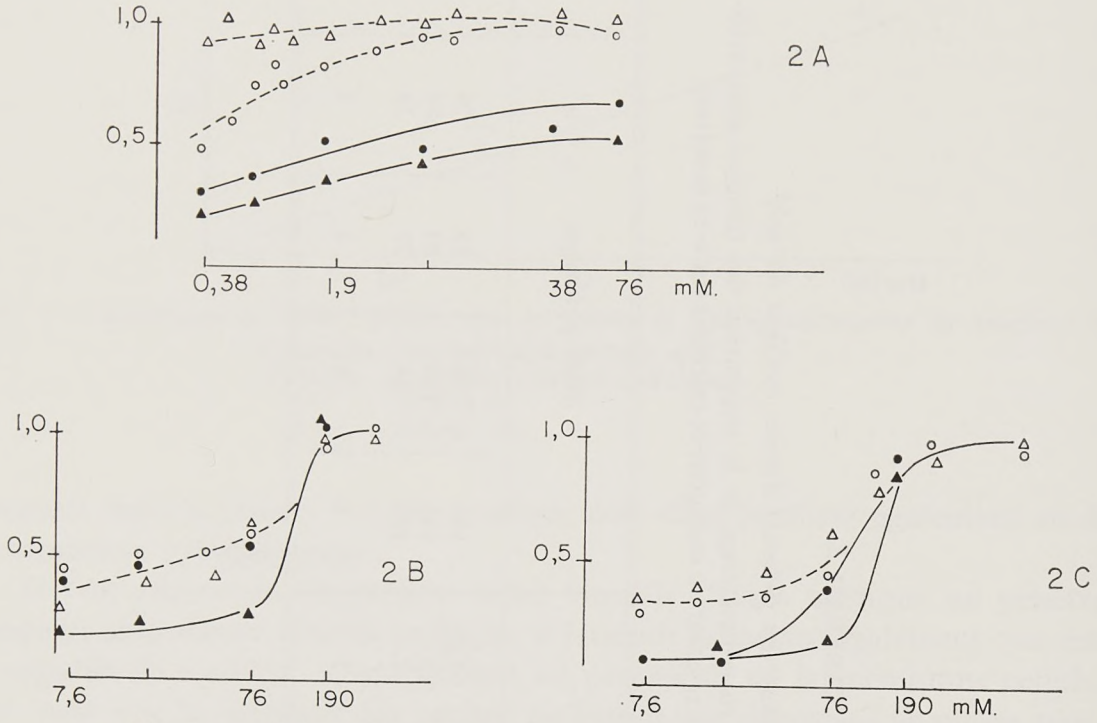


FIG. 2. — *Action de la concentration en substrat sur la vitesse de respiration des acides L-lactique, D-lactique et pyruvique.*

Ordonnées : vitesse relative de respiration
Abscisses : concentration *m*M
2A acide L-lactique
2B acide pyruvique
2C acide D-lactique
○ souche 4 ● souche 4 en présence d'acide oxalique 66 mM
△ souche 183 ▲ souche 183 en présence d'acide oxalique 66 mM.

Les graphiques de la figure 2 montrent la loi d'action de la concentration en substrat sur la vitesse de respiration des acides L et D lactiques et de l'acide pyruvique en présence d'acide oxalique 66 mM. Les vitesses, corrigées pour l'activité due à la respiration des substrats endogènes, sont calculées en pourcentage de la valeur maximum de la vitesse de respiration en absence d'acide oxalique. Chaque point des graphiques représente la moyenne d'au moins 2 expériences indépendantes.

On constate que la souche 183 est plus sensible à l'action de l'acide oxalique que la souche 4. Cette action existe pour de nombreux substrats. Il est donc impossible de connaître avec ces seuls résultats à quel stade chacun d'eux a sa respiration inhibée. Il est probable que l'acide oxalique peut inhiber un grand nombre d'enzymes dans la cellule et que les étapes de l'oxydation où cette inhibition se fait sentir peuvent être multiples.

Par contre, on peut conclure que l'acide oxalique pénètre un peu à l'intérieur

de la cellule : il inhibe fortement la respiration de l'acide acétique alors que celui-ci pénètre librement.

La plus grande sensibilité de la souche 183 doit sans doute être rapportée à une modification de la structure de la cellule. Il a été montré en effet (BIZEAU et GALZY, 1966) que les cellules de la souche 4 sont, dans les conditions de culture utilisées ici, environ deux fois plus grosses que les cellules de la souche 183. Plus précisément, 100 millions de cellules occupent 10 ± 1 μl dans le cas de la souche 4, et 4 ± 1 μl dans le cas de la souche 183. Dans ces conditions, en admettant que chaque cellule est une sphère, la surface de la membrane cytoplasmique est, pour un volume égal de matière vivante, environ 1,37 fois plus grand pour la souche 183 que pour la souche 4. Tous les phénomènes biologiques liés à la surface des membranes et en particulier les phénomènes de perméabilité pourraient être modifiés dans les mêmes proportions. L'apparition d'un effet inhibiteur de l'acide oxalique pour la respiration de l'acide pyruvique chez la seule souche 183 pourrait expliquer aussi la différence de sensibilité entre les deux souches. A l'effet inhibiteur observé chez la souche 4 pour chaque substrat, pourrait s'ajouter chez la souche 183 une inhibition à une étape commune de la respiration (cycle de Krebs ou respiration terminale). Ceci peut-être lié également à une modification de la structure interne de la cellule, sous l'effet de la mutation.

C — *Étude de la cinétique de l'inhibition de la respiration de l'acide L-lactique par l'acide oxalique*

Pour cette étude les courbes représentant les vitesses de respiration en fonction de la concentration en acide L-lactique (fig. 2, graph. 2 A) ont été, comme dans les études précédentes (GALZY, 1964) et pour les mêmes raisons, interprétées d'après la théorie de Michaëlis. On a ainsi calculé dans le système de représentation de Lineweaver et Burk des constantes apparentes de demi-saturation du système respiratoire, en présence et en absence d'acide oxalique, dans la zone de concentration où la souche 183 respire l'acide L-lactique à une vitesse plus grande que ne le fait la souche 4. La réduction à une droite des courbes expérimentales est généralement bonne comme le montre le graphique de la fig. 3.

Une constante d'inhibition a été calculée d'après HUNTER et DOWN (1945). D'après ce mode de calcul, la souche 183 donne des résultats qu'il est difficile de ramener à la loi de Victor Henri-Michaëlis.

Le tableau 2 résume les résultats obtenus. La plus grande sensibilité de la souche 183 à l'acide oxalique se traduit par une constante d'inhibition double de ce qu'elle est pour la souche 4. La valeur de cette constante d'inhibition pour le système respiratoire de la cellule intacte n'a d'ailleurs aucun rapport avec la valeur du Ki de la L-lacticocytochrome C réductase pour l'acide oxalique (1 mM selon SLONIMSKI et LABEYRIE (1964).

L'acide oxalique se conduit, vis-à-vis de la chaîne d'oxydation de l'acide L-lactique par les cellules entières de la souche 4, comme un inhibiteur absolu. Pour la souche 183, les constantes apparentes de demi-saturation sont très différentes en absence et en présence d'acide oxalique ; on pourrait avoir une inhibition compétitive. Mais, comme les constantes apparentes de demi-saturation sont les mêmes

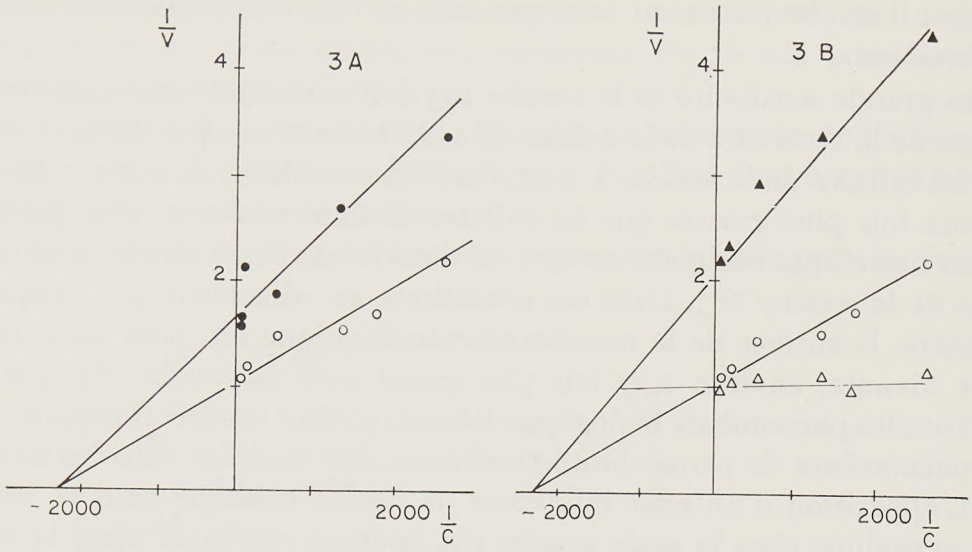


Fig. 3 *Action de la concentration en substrat sur la vitesse de respiration de l'acide L-lactique*

Ordonnées : inverse des vitesses de respiration relatives
Abscisses : inverse des concentrations en substrat
souche 4 { ○ sans acide oxalique
● avec acide oxalique 55 mM
souche 183 { △ sans acide oxalique
▲ avec acide oxalique 55 mM

TABLEAU 2

Inhibition du système respiratoire de l'acide L-lactique dans la cellule intacte en présence d'acide oxalique

(Calcul sur les vitesses de respiration mesurées sur 0-30′ et corrigées pour la respiration endogène)

Souche	Concentration en acide oxalique mM	Constante apparente de demi saturation C_p-mM		Nombre de déterminations indépendantes	Constante d'inhibition mM	
		C_p	limites		C_i	écart type
4	55	0,43	0,21-0,72	5	60	9
	37	0,31	0,20-0,43	5		
	0	0,44	0,25-0,80	5		
183	55	0,36	0,32-0,40	6	29	5
	37	0,37	0,08-0,66	6		
	0	0,032	0 -0,10	3		

pour les deux concentrations d'acide oxalique utilisées, comme par ailleurs ces constantes ont des valeurs égales à celles qui ont été obtenues avec la souche 4, il paraît plus logique de conclure que l'acide oxalique aux concentrations utilisées abolit la

différence qui existe entre les deux souches, quant à leur cinétique de respiration. Ceci apparaît très nettement sur le graphique de la figure 3. En présence d'acide oxalique les courbes obtenues avec 4 et 183 ont la même origine sur l'axe des abscisses.

DISCUSSION

Mis à part l'acide pyruvique, tous les substrats étudiés ici ont leur respiration inhibée par l'acide oxalique. Il est donc bien difficile de dire pour chacun d'eux sur quel site se produit cette inhibition.

Deux arguments permettent cependant d'avancer qu'elle peut avoir lieu à l'intérieur de la cellule. D'abord la respiration de l'acide acétique est inhibée alors que l'acide acétique pénètre librement. Ensuite la mutation fait apparaître un effet d'inhibition dans le cas de l'acide pyruvique. Il y a peu de chance pour que la mutation PL_5 vers pl_5 ait entraîné une modification du mécanisme de pénétration du seul acide pyruvique. Selon toute probabilité l'acide oxalique pénètre au-delà de la membrane cytoplasmique. L'apparition, chez la souche mutante, d'une inhibition de la chaîne des oxydations cellulaires au-delà du stade acide pyruvique, explique peut-être la sensibilité plus grande de cette souche à l'action de l'acide oxalique.

Dans le cas particulier de l'acide L-lactique, la simplicité de la loi d'action de la concentration en substrat sur la vitesse de respiration de la cellule entière permet d'analyser la cinétique du phénomène d'inhibition. Non seulement la souche 183 est plus sensible à l'action de l'acide oxalique, mais en plus, celui-ci modifie la cinétique de la respiration, et abolit pratiquement la différence que la mutation avait fait apparaître entre les deux souches. On remarque que l'inhibition de la respiration de l'acide L-lactique par l'acide oxalique n'est pas compétitive. Elle ne s'exerce donc pas, ou pas seulement au niveau du site actif de la L-lacticocytochrome C réductase. Il n'est donc pas possible de vérifier ainsi si cet enzyme fonctionne de façon différente dans la cellule et *in vitro*. Il est vérifié par contre que l'action du gène pl_5 est pléiotrope et sans doute liée à une profonde modification dans la structure de la cellule.

CONCLUSION

L'acide oxalique inhibe la respiration des deux souches de levures étudiées. La souche mutante est inhibée de façon un peu plus intense. L'action de l'acide oxalique est surtout nette sur la cinétique de la respiration de l'acide L-lactique. Cette cinétique est différente pour les deux souches en absence d'acide oxalique. Elle devient semblable en sa présence.

Reçu pour publication en avril 1967.

SUMMARY

STUDY OF THE INHIBITION OF L-LACTIC ACID RESPIRATION BY OXALIC ACID IN CERTAIN « SMOOTH COLONY » MUTANTS OF « SACCHAROMYCES CEREVISIAE » HANSEN

A study was made of the respiratory metabolism of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN in the presence of oxalic acid.

These two strains only differed in a pair of genes. An important physiological difference is associated with this genetic difference. L-lactic acid is respired much better at weak concentrations by one of the two strains. This difference seems to be concealed in the presence of oxalic acid.

RESUMEN

ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA RESPIRACIÓN DEL ÁCIDO L-LÁCTICO POR EL ÁCIDO OXÁLICO EN EL CASO DE CIERTOS MUTANTES « COLONIAS LISAS » DE « SACCHAROMYCES CEREVISIAE » HANSEN

Ha sido estudiado el metabolismo respiratorio de dos estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN, puestas en presencia de ácido oxálico.

Estas dos estirpes únicamente se diferencian por un par de genes. A esta diferencia genética corresponde una diferencia fisiológica importante : el ácido L-láctico es mucho mejor respirado, por una de las dos estirpesmando se presenta en concentraciones reducidas. Esta diferencia parece disimulada por la acción del ácido oxálico.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIZEAU C., GALZY P., 1965. Étude de la respiration de quelques substrats non fermentescibles par *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *Ann. Technol. agric.*, **14** (3), 275-289.

BIZEAU C., GALZY P. Influence de la mutation du gène PL5 vers pl_5 sur le volume cellulaire d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN dans diverses conditions expérimentales. *C. R. Acad. Sci.*, **263**, 116-119.

CONWAY — E. J, DOWNEY Mary, 1950. An outer metabolic région of the yeast cell. *Biochem. J.* **47**, 347-355.

GALZY P., 1964., Étude génétique et physiologique du métabolisme de l'acide lactique chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *Ann. Technol. agric.*, **13** (2), 109-259.

JAULMES P., ESPEZEL E., 1935. Technique de dosage de l'acétaldéhyde. *Ann. Fals. Fraudes*, **325**. D'après JAULMES P., 1951. *Analyse des Vins*, p. 418. Poulain Éd., Montpellier.

HUNTER A., DOWN C. E., 1945. *J. biol. Chem.*, **157**, 427. D'après DIXON M., 1960. *Enzymes*, Longmans Éd., London.

KOTYK A., 1963. pH intracellulaire de la levure de bière. *Folia microbiologica*, 827-831.

SLONIMSKY P. P., LABEYRIE Françoise, 1964. Mode d'action des Lacticodéshydrogénases liées aux systèmes flavinique et cytochromique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **46**, 12, 1793-1828.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (2), 135-189.

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

LES PROTÉINES SOLUBLES DES CÉRÉALES

P. FEILLET

Laboratoire d'Études et de Contrôle de la Qualité des Blés français, 75 - Paris, 13e.
Institut national de la Recherche agronomique

PLAN

INTRODUCTION.

I. — EXTRACTION DES PROTÉINES SOLUBLES.
11. *Conditions générales de solubilisation.*
12. *Élimination de certains constituants des graines modifiant la solubilité des protéines.*

II. — PURIFICATION ET FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES SOLUBLES.
21. *Purification et fractionnement par solubilité différentielle.*
22. *Purification et fractionnement par des méthodes physicochimiques.*

Conclusions.

III. — PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES PROTÉINES SOLUBLES.
31. *Propriétés physicochimiques.*
32. *Métabolisme.*
33. *Importance quantitative.*

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

INTRODUCTION

Les protéines des céréales ont retenu depuis très longtemps l'attention des chimistes ; dès 1745 en effet, BECCARI réalisait l'extraction du gluten à partir de la farine de blé. C'est à OSBORNE (1907) et ses élèves que l'on doit la première étude systématique ; cet auteur distingue 4 groupes : les Albumines, solubles dans l'eau et les solutions salines diluées ; les Globulines, solubles en milieu salin neutre, mais insolubles dans l'eau; les Prolamines, extraites par l'éthanol aqueux; les Glutélines, fraction résiduelle, solubles en milieu alcalin. D'une manière plus générale, on a l'habitude de regrouper les deux premiers groupes sous le terme de « Protéines solubles », et les deux derniers sous celui-de « Protéines du Gluten ». Bien qu'insuffi-

sants et un peu arbitraires [1], ces caractères de solubilité demeurent toujours très utilisés pour différencier les protéines des céréales ; nous conserverons donc, tout au long de cet exposé, la terminologie que nous venons de rappeler.

Bien que les protéines du gluten aient été les plus étudiées en raison de leur importance technologique (DIMLER, 1965), une somme considérable de travaux a néanmoins porté, au cours des dix dernières années, sur les protéines solubles des céréales, plus spécialement sur celles du blé, de l'orge et du maïs. Si des revues déjà anciennes ou partielles leur ont été consacrées (BOURDET, 1956 ; DJURTOFT, 1961 ; ENARI, 1965 ; ENARI, 1966 ; FEILLET, 1966 ; HARRIS, 1962 *a* ; LASZETITY et NEDELKOVITS, 1964 ; LUNDIN, 1963 ; PACE, 1961 ; PENCE et NIMMO, 1964 ; PENCE et *al.*, 1964 ; POOL et SHOOTER, 1955 *a* ; STONE et HAMDY, 1964, STAHMANN, 1963 ; SULLIVAN, 1965 ; WALL, 1964) aucune synthèse des connaissances actuelles sur les albumines et les globulines des céréales n'a été entreprise. L'objet de cette étude est d'essayer de remédier à cette absence, en insistant davantage sur les travaux relatifs au blé et à l'orge, qui sont de beaucoup les plus nombreux. La mise au point de MOSSE (1967) sur les protéines des céréales pourrait éventuellement servir d'introduction à cette revue.

Dans une première partie, nous préciserons les conditions générales d'extraction des protéines solubles. Nous verrons ensuite à quels résultats ont conduit les méthodes de purification et de fractionnement actuellement utilisées. Le troisième et dernier chapitre sera consacré à l'exposé des propriétés physico-chimiques de ces protéines, à leur métabolisme, et à leur importance quantitative. Nous laisserons volontairement de côté l'étude de leur rôle technologique, ayant récemment abordé cette question par ailleurs (FEILLET, 1967). L'aspect nutritionnel ne sera pas abordé non plus.

I. — EXTRACTION DES PROTÉINES SOLUBLES

Contrairement à de nombreuses protéines, celles des céréales ne sont pas naturellement en solution. Mélangées en proportions variables à un milieu très complexe, peu hydraté et constitué en majeure partie d'amidon, elles rentrent pour 10 p. 100 [2] en moyenne dans la composition des farines. Les protéines solubles elles-mêmes ne représentent que de 10 à 20 p. 100 des protéines totales.

La solubilisation sélective et totale des albumines et des globulines sous une forme aussi peu dénaturée que possible est donc la première étape de leur étude.

I. 1. CONDITIONS GÉNÉRALES DE SOLUBILISATION

Les conditions d'extraction varient beaucoup d'un auteur à l'autre. Certains recherchent une extraction totale et quantitative, d'autres se contentent d'un extrait

[1] Les prolamines, très solubles dans l'éthanol 60-70 p. 100, au moins en partie solubles dans l'eau, auraient sans doute davantage droit à l'appellation « Protéines solubles » que les globulines.

[2] La composition moyenne des farines de céréales en protéines (N × 5,7) est la suivante (p. 100 m.s.): blé : 9-13 ; orge : 10 ; seigle : 7 ; avoine : 11 ; riz : 7 ; maïs : 6,5 (BOURDET, 1956).

qualitativement représentatif, d'autres, enfin, tentent de réaliser une solubilisation différenciant les albumines des globulines.

De ce fait, la nature, le pH et la concentration des solutions salines utilisées, le nombre, la température et la durée des extractions, le rapport farine/solvant (gramme de farine par millilitre de solvant) sont les principaux paramètres susceptibles de variation.

1.1.1. *Nature, pH et concentration saline des solutions d'extraction.*

Les sels les plus fréquemment utilisés sont le chlorure de sodium 0,1 M (KELLEY et KOENIG, 1962) ou 0,5 M (PENCE et ELDER, 1953) amenés à un pH voisin de 7 par une solution tampon de phosphate (QUENSEL 1942), et le pyrophosphate neutre de sodium (COATES et SIMMONDS, 1961)

Précisant les travaux de GORTNER et *al.* (1929), PENCE et *al.* (1954 *a*) étudient l'action exercée par diverses solutions salines de même concentration sur la solubilité des albumines, des globulines et des gliadines de la farine de blé (1). Des résultats obtenus (tabl. 1) PENCE conclut à la supériorité d'une solution 0,5 M NaCl (pH ajusté à 6,8 par un tampon phosphate) pour extraire la plus grande quantité d'albumines et de globulines.

TABLEAU I

Influence de la nature des sels sur la solubilisation des protéines du blé (PENCE et *al.*, 1954 *a*).

Nature des Sels	N protéique extrait (p. 100 N portéique total)			
	N total	N albumines	N globulines	N gliadines
LiCl	22,9	8,3	6,0	8,7
NaF	13,5	6,0	4,7	1,3
NaCl	21,4	7,6	7,6	6,2
NaBr	32,7	9,6	6,5	16,7
$MgCl_2$	29,9	9,2	7,1	15,5
$CaCl_2$	27,8	8,2	6,6	14,8
$MgSO_4$	16,9	7,2	8,2	1,3
K_2SO_4	17,0	6,7	8,0	2,8
Na_3BO_4	22,6	7,7	3,7	11,2

Selon cet auteur, la quantité de gliadines dissoutes est essentiellement conditionnée par la nature du sel utilisé.

L'interprétation des résultats expérimentaux de ce même travail conduit NARAYAN et *al.* (1965) à retenir $MgSO_4$ 0,5 M de manière à solubiliser le minimum de gliadine. PENCE et ELDER (1953) ayant montré par ailleurs que la gliadine précipitait dans $(NH_4)_2SO_4$ 0,4 M, on peut supposer que l'insolubilisation de la prolamine du blé dans $MgSO_4$ et dans $(NH_4)_2SO_4$ est due à l'anion commun SO_4^{--}. MOUREAUX

(1) Les proportions respectives des trois groupes protéiques sont déterminées en mesurant la composition en azote amidé et en tryptophane des extraits.

(1965) et DESCHREIDER (1964 *b*) ont effectivement montré que SO_4^{--} solubilisait moins fortement les protéines de la farine que Cl^-. Dans cette dernière étude, DESCHREIDER a cherché à préciser l'influence des anions et des cations sur la solubilisation des protéines de la farine ; sa conclusion inattendue est que la présence de cations métalliques a pour effet d'extraire plus de gliadine 5.

Selon MOUREAUX (1965), la présence d'ions phosphates insolubilise les gliadines, ce qui justifie l'emploi des solutions phosphates ou pyrophosphates par les autres auteurs. FOSTER et *al.* (1950) ont également noté l'action insolubilisante des ions phosphates sur les protéines du maïs.

Dans le cas de l'orge, DJURTOFT (1961) démontre que les meilleurs conditions d'extraction sont obtenues par NaCl M en milieu neutre ou légèrement acide, tandis qu'ENARI et *al.* (1962 *b*), précisant l'influence de la concentration en sel et de la valeur du pH sur la quantité de protéines solubilisées (tabl. 2), concluent à la supériorité de NaCl 0,3 M tamponné à pH = 7,0 par une solution phosphate 0,1 M pour extraire le maximum de protéines ; ils solubilisent ainsi légèrement plus d'azote qu'avec la solution de K_2SO_4 0,03 M préconisée par BISHOP (1929).

TABLEAU 2

Effet de la concentration en sel et du pH sur la solubilisation des protéines de l'orge (ENARI et *al.*, 1962 *b*).

Solution d'extraction			Extrait	
NaCl M	Tampon	pH	pH	Concentration protéique (Unité SSA)
0,3	—	4,7	5,3	117
1,0	—	4,7	5,3	135
0,3	0,01 M barbital	7,0	5,8	194
1,0	0,01 M barbital	7,0	5,8	218
0,3	0,05 M barbital	7,2	6,3	225
1,0	0,05 M barbital	7,2	6,2	229
0,3	0,10 M phosphate	7,0	6,9	260
1,0	0,10 M phosphate	7,0	6,8	250

Comparant la nature des protéines de l'orge extraites par un tampon véronal (μ = 0,3) à trois pH (9,0, 8,2 et 7,4), HILL et DJURTOFT (1964) montrent que :

— le tampon pH = 9,0 solubilise le maximum de composants ;

— les fractions faiblement anioniques et cationiques s'extraient plus facilement à un faible pH ;

— mal solubilisées à pH = 7,4, les globulines le sont bien davantage à pH = 9,0.

Par ailleurs, la dialyse de cet extrait contre un tampon pH = 8,6 provoque un abondant précipité brun alors qu'un simple trouble apparaît à pH = 9,0, ce que ces auteurs expliquent par l'observation de MEJBAUM-KATSENELLENBOGEN (1959) selon laquelle les complexes protéines-tannins ne pourraient se former au-dessus de pH = 8,6. HILL et DJURTOFT (1964) retiennent finalement un tampon bicarbonate/carbonate

pH 9,2 ; le pH diminuant toujours au cours de l'extraction (ENARI et *al.*, 1962 *b*), le pH final est de 8,4 environ.

Il faut enfin noter, ainsi qu'il ressort des études de POOL et SHOOTER (1955 *b*) que la teneur des extraits peut être considérablement modifiée par la vitesse à laquelle ceux-ci ont été centrifugés : un extrait salin d'orge centrifugé à 1 200 *g* contient 18,3 p. 100 N total ; le même extrait centrifugé à 18 000 *g* n'en contient plus que 14,3 p. 100 soit une diminution relative supérieure à 20 p. 100.

Certains auteurs extraient les protéines solubles par l'eau (CRAINE et FARHENHOLTZ, 1958 ; ENARI et *al.*, 1962 *a* ; BAUDET et MOSSE, 1962 ; NIMMO et *al.*, 1963) ; dans ces conditions, et au moins pour le blé, les solutions obtenues représentent un matériel protéique plus complexe en raison de l'hydrosolubilité de la gliadine (PENCE et ELDER, 1953 ; ELTON et EWART, 1962 ; KAMINSKI, 1962 ; GRAHAM, 1963 ; BOURDET et *al.*, 1963).

1. 1. 2. *Dilution* et *condition d'agitation.*

Suivant les auteurs, le rapport farine/solvant est compris entre 1/2 (COATES et SIMMONDS, 1961 ; GRAHAM, 1963) et 1/8,7 (PENCE et ELDER, 1953) ; la durée et le nombre des extractions varient respectivement de 30 minutes (PENCE et ELDER, 1953) à 300 minutes (KAMINSKI, 1962) et de 1 (KELLEY et KOENIG, 1962 ; GRABAR et *al.*, 1962) à 4 (COATES et SIMMONDS, 1961) ; l'agitation est généralement douce (tabl. 3).

TABLEAU 3

Conditions d'extraction des protéines solubles du blé et du maïs.

Auteurs → / Conditions d'extraction ↓	PENCE et ELDER (1953)	COATES et SIMMONDS (1961)	GRABAR et *al.* (1962)	KELLEY et KOENIG (1962)	GRAHAM (1962)	KAMINSKI (1962)	GEHRKE et *al.* (1964)	FEILLET (1965)	MERTZ et *al.* (1958)
Nature du sel	NaCl	Pyroph.	NaCl	NaCl	Pyroph.	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
Concentration saline	0,5 M	0,01 M	0,5 M	0,1 M	0,01 M	0,2 M	0,015 M	0,5 M	0,8 M
pH d'extraction	6,8	7,0	7,0	—	7,4	7,0	—	6,8	6,8
Durée d'extraction (mn)	30 à 40	90	120	120	5	300	30	60	24 h
Température d'extraction	—	4°	4°	amb.	2°	—	amb.	4°	2°
Nombre d'extractions	2	4	1	1	4	1	1	3	4
Farine/Solvant (g/ml)	1/8,7	1/2	—	1/4	1/2	1/7,5	1/2	1/7	1/11
Type d'agitation	doux	—	—	—	doux	fort	—	doux	—
Élimination des lipides	—	+	—	—	+	—	+	—	+
Céréale	Blé								Maïs

Identifiant et estimant semi-quantitativement par électrophorèse en gel d'amidon les protéines du blé solubles en milieu salin neutre (NaCl 0,5 M ; tampon phosphate pH = 6,8), FEILLET (1965) montre que la quantité d'albumines et de globulines dissoute est presque indépendante de la dilution et de la durée de l'extraction,

et que la concentration 0,5 M est optimale. Selon le même auteur, une extraction trop énergique (temps d'extraction ou dilution trop importante) solubiliserait davantage de gliadines ; il préconise donc 1 heure d'extraction sans agitation et un rapport farine/solvant égal à 1/4. Dans ces conditions, 5 p. 100 de la gliadine de la farine seraient solubilisées. Selon ENARI et *al.* (1962 *b*), l'extraction des protéines de l'orge est complète après 30 minutes (rapport farine/solvant de 1/4). Ces derniers auteurs montrent que l'extraction est aussi efficace à froid (3°) qu'à température ordinaire (25°) ; il est donc toujours souhaitable de travailler à basse température.

MOSSE et BAUDET (1963) étudient les conditions d'extraction par l'eau des protéines de la farine de blé et solubilisent le maximum de protéines sous la forme la plus concentrée possible en réalisant 4 ou 5 extractions successives, à température ambiante, les deux premières à une faible dilution (5 ou 10) et avec un temps d'agitation bref (10 mn), les suivantes à plus grande dilution (10 à 50) et avec une durée d'agitation de 1 à 2 heures ; ils réalisent ainsi un fractionnement dont les substances dialysables de la farine sont responsables (MOUREAUX, 1965) ; la première fraction est en majeure partie constituée d'albumines et de globulines ; les suivantes correspondent à des gliadines (MOSSE et *al.*, 1964 ; LANDRY et *al.*, 1965).

1. 1. 3. *Granulométrie du matériel étudié.*

Selon URION et *al.* (1944), la quantité de protéines extraites est d'autant plus forte que le grain (orge) est plus finement broyé. Mais ENARI et *al.* (1962 *b*) se demandent si cette solubilisation plus importante n'est pas due à une transformation des protéines sous l'effet de la chaleur. Ces derniers auteurs préconisent un broyage avec un moulin Miag-Seck qui permet d'obtenir sans échauffement une mouture

TABLEAU 4

Influence de la granulométrie des farines sur la solubilité des protéines en milieu salin (BAUDET et *al.*, 1966).

Nature des farines	mg protéines extraites pour 100 g farine
Finots	1 250
Finots type farine	1 250
Finots type farine broyée	1 280

suffisamment fine. Par ailleurs, POOL et SHOOTER (1955 *b*) remarquent que les nombreuses filtrations nécessaires à la clarification des extraits de grains broyés selon URION et *al.* (1944) provoquent des pertes azotées annulant les gains dus au broyage. Récemment, nous avons pu montrer (BAUDET et *al.*, 1966) que, dans les limites de notre expérimentation, les dimensions des particules de farine (blé) n'intervenaient pas sur la quantité et la nature des protéines solubilisées en milieu salin (tabl. 4).

L'opposition entre nos résultats et ceux d'URION n'est sans doute qu'apparente. Cet auteur a en effet travaillé sur le grain entier et l'on conçoit alors qu'un broyage

très poussé est nécessaire à la pulvérisation des enveloppes et de l'assise protéique, tandis que nos analyses ont porté sur la farine issue de l'endosperme facilement dispersé.

1. 1. 4. *Solubilisation continue sur colonne.*

Bodo (1961), puis Maes (1962), Mosse et *al.* (1964), Deschreider (1965), Mattern et *al.* (1966), Cagampang et *al.* (1966) procèdent à une extraction continue sur colonne de la farine.

La technique consiste à mélanger la farine à un support inerte très divisé et à soumettre l'ensemble à une percolation par les solvants retenus (Schwerdtfeger, 1958). Selon Mosse et *al.* (1964), il est nécessaire de purifier soigneusement le quartz ou le sable constituant le support ; la moitié des protéines de la farine de blé est alors solubilisée par l'eau, proportion nettement supérieure à celle obtenue par Maes (1962). Deschreider (1965), par contre, ne pense pas que les impuretés présentes dans le sable puissent expliquer les différences observées ; cet auteur constate en effet une extraction identique, que le sable utilisé par Maes (1962) soit purifié suivant la technique décrite par Mosse et *al.* (1964) ou non.

Il s'opère un fractionnement en 2 groupes de constituants f_1 et f_2 au cours de l'extraction, dont le deuxième est de nature gliadine (Mosse et *al.*, 1964 ; Deschreider, 1965). D'après Baudet et *al.* (1965) la dissolution de la fraction f_2 est conditionnée par un double mécanisme : la disparition de l'acide phytique par suite de son hydrolyse par la phytase de la farine et l'élimination des phosphates présents.

Deschreider (1965) note enfin que la présence de pierre ponce en poudre a pour effet de diminuer sensiblement l'importance de f_2.

Cette technique présente l'avantage de solubiliser les protéines sous forme de solutions parfaitement limpides et dans des conditions aussi peu dénaturantes que possible ; à noter comme inconvénient le fait qu'elle provoque des dilutions très importantes nécessitant ensuite de longues opérations de concentration.

1. 2. Élimination de certains constituants des grains modifiant la solubilité des protéines

Il est bien évident que les préparations protéiques ainsi isolées représentent un matériel très impur. Si la dialyse permet d'éliminer les petites molécules (sels minéraux, glucides simples, azote non protéique ...), les préparations obtenues ne demeurent pas moins souillées de nombreuses substances étrangères dont les plus importantes sont les pentosanes.

On a donc cherché à obtenir des extraits purifiés soit par élimination de substances contenues dans les produits broyés et capables d'interférer sur les résultats de l'extraction (lipides, polyphénols, acide phytique) soit par traitement direct des extraits.

Nous proposant d'indiquer dans le chapitre II, comment le fractionnement des extraits, par relargage notamment, conduit à leur purification, nous nous contenterons d'étudier dans ce paragraphe :

la délipidation du matériel d'étude ;
l'élimination des polyphénols ;
l'action des phytates.

1. 2. 1. *Lipides.*

Selon MORTON (1955), les lipides présents dans les extraits pyrophosphates de grains broyés produisent des interférences considérables sur le fractionnement des protéines solubles par le sulfate d'ammonium ou l'éthanol. On comprend donc que plusieurs auteurs délipident les produits de mouture avant d'extraire les albumines et les globulines ; les solutions obtenues sont alors très limpides. On a utilisé l'éther de pétrole (CRAINE et FHARENHOLTZ, 1958 ; BILINSKI et MCCONNEL, 1958), l'acétone (ENARI et *al.*, 1962 *b*) ou le butanol saturé d'eau (COATES et SIMMONDS, 1961 ; GRAHAM, 1963 ; GEHRKE et *al.*, 1964) ; ce dernier solvant préconisé par MECHAM et MOHAMMAD (1955), est considéré comme peu dénaturant (MORTON, 1950) ; ce serait le plus efficace, mais il est difficile à éliminer. L'acétone, qui n'extrait pas les lipides complexes, doit respecter les éventuelles associations lipoprotéiques existant dans le grain.

KELLEY et KOENIG (1962) notent que la composition électrophorétique (en veine liquide) d'un extrait salin de farine de blé délipidée (par le butanol saturé d'eau) diffère dans la répartition des pics de celle d'un extrait de farine non traitée ; ELTON et EWART (1962), par contre, ne décèlent pas de modification dans les diagrammes électrophorétiques en gel d'amidon.

Selon GRAHAM (1963), le traitement préalable de la farine par le butanol n'a pas d'effet sur le nombre et la mobilité des fractions extraites par le pyrophosphate de sodium, mais diminue la quantité d'azote solubilisé dans les mêmes conditions (9,1 p. 100 N total à partir d'une farine délipidée au lieu de 12,6 p. 100 N total). MAES (1962) et DESCHREIDER (1965) montrent également que la délipidation diminue le rendement de l'extraction des protéines sur colonne de sable.

HILL et DJURTOFT (1964) confirment que la délipidation de l'orge broyée par le butanol saturé d'eau est très efficace ; les extraits ainsi traités possèdent alors 3 à 4 protéines non décelables autrement par immunoélectrophorèse.

1. 2. 2. *Polyphénols.*

Les extraits salins sont toujours souillés de substances polyphénoliques ; celles-ci provoquant l'insolubilisation de certaines fractions protéiques et intervenant dans le brunissement des solutions, il est souhaitable de les éliminer.

RONDELET et LONTIE (1955) constatent que les polyphénols de l'orge sont presque exclusivement localisés dans les téguments et recommandent de travailler sur des farines, ou au moins des grains décortiqués.

Au cours d'une étude sur la stabilité de la bière, CHAPON et *al.* (1961) montrent que le trouble apparaissant au repos est dû à une association des protéines (P) et des tannoïdes (T) (substances polyphénoliques) régie par l'équilibre :

$$P + T \rightleftarrows PT.$$

Il n'est donc pas impossible que l'effet clarifiant exercé sur des extraits salins d'orge après repos prolongé au froid (MIKOLA et *al.*, 1962) repose en partie sur des phénomènes voisins ; selon ces derniers auteurs, l'hydrolyse des polysaccharides solubles et de l'acide phytique interviendrait principalement. Pour RONDELET et LONTIE (1955), le précipité formé serait de nature phytique, résultat qu'infirment les

travaux de BOURDET et FEILLET (1967) où il est montré que le phosphore trouvé dans les précipités est de nature nucléique et lipidique. Par ailleurs, MIKOLA et *al.* (1962) ont mis en évidence que ces précipités étaient très riches en substances glucidiques.

On peut rapprocher de ces résultats les travaux de SANDEGREN (1948) selon lesquels le trouble au froid de la bière est caractérisé par 35 à 40 p. 100 de tanin et 60 à 65 p. 100 d'une protéine issue de la bêta-globuline. Ce précipité est différent du « trouble fin » qui se forme au cours du brassage et qui serait, comme l'a montré SCRIBAN (1950) dû à une substance comparable, sinon identique, à l'hordéine.

Notons que COATES et SIMMONDS (1961), remarquant l'intérêt d'un repos prolongé réalisent une dialyse de longue durée pour clarifier les extraits. Selon COULSON et SIM (1961), ce repos au froid provoque également une augmentation de la teneur en protéines de mobilité électrophorétique moyenne (type albumines) aux dépens des fractions moins mobiles (type prolamines). ELTON et EWART (1964) attribuent ce phénomène à une attaque préférentielle des gliadines par les enzymes protéolytiques de l'extrait.

De plus, ces auteurs ne notent pas d'amélioration dans la qualité des diagrammes électrophorétiques sur gel d'amidon après repos au froid, contrairement à ce qu'avaient observé MIKOLA et *al.* (1962) en électrophorèse sur papier des protéines de l'orge. On pourrait expliquer cette différence, selon ELTON et EWART (1964) par la nature des supports électrophorétiques utilisés.

ENARI et *al.* (1962 *b*) notent que l'addition d'acide éthylènediamine tétracétique (EDTA) (2 g par litre) empêche la formation de précipités irréversibles et le brunissement des extraits. Puisque les polyphénoloxydases contiennent du cuivre, l'EDTA pourrait, selon ces auteurs, inhiber ces enzymes et prévenir la formation de grosses molécules polyphénoliques associées aux protéines. Par ailleurs, les précipités irréversibles qui apparaissent par relargage au sulfate d'ammonium ou par dialyse ne sont pas supprimés par la présence d'EDTA et auraient donc des origines différentes (complexes phytiques et glucidiques).

Dans le but d'éliminer une grande partie des polyphénols et la majorité des polyphénoloxydases, GIJSEL et *al.* (1961) et PRÉAUX et *al.* (1963) utilisent des farines d'orge décortiquée traitées par l'acétone 75 p. 100 à — 15°, selon la technique de LONTIE et VOESTS (1959).

HILL et DJURTOFT (1964) cherchent à éviter la formation des complexes protéines-tanins insolubles en ajoutant de la caféine à leurs extraits ; la teneur en tanins des préparations isolées est alors plus faible qu'après une heure de dialyse, mais de la caféine reste fixée.

1. 2. 3. *Phytates.*

Le rôle des ions phytiques dans la solubilité des protéines a été souligné par BARRÉ (1951). Cet auteur note que l'acide phytique forme des complexes insolubles avec les protéines des amandes à pH = 5,0 et possède la propriété remarquable d'associer entre elles plusieurs fractions protéiques lors de leur préparation, rendant ainsi difficile leur différenciation ultérieure. Certains auteurs ont donc cherché à éliminer ces composés phosphorés de l'inositol soit par relargage par les sels neutres,

soit par dialyse prolongée, soit enfin par précipitation sous forme de sel de calcium en milieu alcalin.

RONDELET et LONTIE (1955) rejettent la méthode de relargage par les sels neutres en raison des dialyses prolongées nécessaires mais peu souhaitables et des précipitations partielles mais irréversibles de certaines fractions. Bien que la dialyse directe des solutions puisse donner de bons résultats, la nécessité d'opérer à pH supérieur à 7 (COURTOIS et BARRÉ, 1949) risquerait de provoquer la dénaturation des globulines (orge). Selon ces auteurs, le meilleur procédé consisterait donc à précipiter l'acide phytique par les ions Ca^{++} à pH = 7,5. Dans ces conditions, une partie des globulines est néanmoins éliminée.

CRAINE et FARHENHOLTZ (1958) préconisent l'absorption des phytates sur une résine échangeuse d'ions (Dowex 10) de préférence à la précipitation calcique. Dans leurs conditions expérimentales, 99 p. 100 du phosphore sont éliminés des préparations protéiques ; les extraits de maïs ainsi traités sont limpides et stables ; les produits lyophilisés sont totalement solubles.

Certains auteurs se contentent d'une simple dialyse en tampon phosphate, à pH = 6,7 (GIJSEL et *al.*, 1961) ou 7,3 (PRÉAUX et *al.*, 1963), tandis qu'ENARI et MIKOLA (1961 *a*) ajoutent de l'EDTA aux extraits aqueux pour éviter la formation des composés phytiques insolubles (nous avons vu au paragraphe précédent que l'action de l'EDTA était en fait plus complexe).

Selon BOURDET et FEILLET (1967), les complexes qui peuvent se former entre l'ion phytique et certaines fractions des albumines du blé en milieu acide (pH 3,5) resteraient solubles. En milieu neutre, la seule action de la phytase extraite de la farine avec les protéines solubles suffirait à éliminer la totalité de l'acide phytique. Toutes les précautions prises pour éliminer celui-ci seraient donc inutiles.

MOUREAUX (1965), enfin, montre l'effet insolubilisant de l'acide phytique sur la gliadine.

***

Il n'est malheureusement pas possible, au terme de cette première partie, d'indiquer quel protocole retenir pour solubiliser les protéines solubles des céréales dans les meilleures conditions. La technique à utiliser dépendra essentiellement des buts que l'on poursuit ; suivant que l'on voudra extraire la totalité des protéines solubles, indépendamment de leur nature, ou solubiliser et doser sélectivement les albumines-globulines, ou isoler, sans préoccupation quantitative, des protéines aussi dépourvues que possible d'impuretés non protéiques, le schéma expérimental sera différent :

— dans le premier cas, on s'efforcera d'employer les moyens les plus puissants, sous réserve qu'ils ne soient pas dénaturants : extractions multiples, ou continues sur colonne, grands volumes de solvant, agitation puissante, contact farine/solvant prolongé ;

— dans la deuxième hypothèse (extraction sélective), on devra faire un compromis entre isoler la totalité des albumines et des globulines en entraînant des prolamines, et n'extraire qu'une fraction des albumines-globulines, celles-ci n'étant pas souillées des autres groupes protéiques. De toute manière, l'utilisation de tam-

pons contenant des ions PO_4^{---}, précipitant des gliadines, est à recommander pour l'étude des protéines solubles du blé ;

— dans le dernier cas, on se préoccupera de l'élimination des lipides, des polyphénols et dans certains cas des phytates.

II. — PURIFICATION ET FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES SOLUBLES

Les extraits salins ou aqueux, obtenus dans les conditions décrites au chapitre précédent, sont extrêmement complexes. Des substances non protéiques (pentosanes essentiellement) et des prolamines passent en effet en solution avec les albumines-globulines. Le biochimiste intéressé par l'étude physicochimique des fractions constitutives de ces dernières doit donc réaliser au préalable la purification et le fractionnement des extraits.

En fait, plusieurs problèmes étroitement imbriqués se posent simultanément :

— éliminer les constituants non protéiques et les prolamines ;

— isoler les albumines et les globulines, groupes protéiques définis par leur caractéristique de solubilité ;

— isoler les fractions constitutives de ces groupes.

A cet effet, il existe un certain nombre de techniques que nous avons regroupées dans ce chapitre sous deux rubriques principales : d'une part des techniques basées sur la solubilisation différentielle des constituants qui réalisent principalement l'isolement et la purification des albumines et des globulines ; d'autre part des techniques plus élaborées (ultracentrifugation, électrophorèse, chromatographie) dont certaines sont plus analytiques que préparatives mais dont le pouvoir de séparation permet d'espérer, *a priori*, une résolution beaucoup plus poussée.

Il est par ailleurs souvent difficile de préciser le degré de purification réalisée : une faible teneur en azote d'une préparation témoigne-t-elle de la présence d'impureté contaminant la protéine isolée ou n'est-elle due qu'à la présence d'une hétéroprotéine ? Sur quels critères affirmer l'absence de prolamines ? Comment être certain de l'homogénéité d'une fraction protéique ? Il faut reconnaître que l'expérimentateur est souvent démuni, les conclusions étant souvent opposées selon que l'on s'adresse à une technique ou à une autre.

On est néanmoins arrivé à préciser ce que l'on pouvait espérer des différentes méthodes expérimentales. L'objet de ce chapitre est de faire l'inventaire des travaux réalisés dans ce sens.

2. 1. Purification et fractionnement par solubilité différentielle

Nous envisagerons dans ce paragraphe les méthodes de purification et de fractionnement des protéines solubles basées sur des caractéristiques de solubilité :

dialyse ;
relargage ;
précipitation par des solvants organiques.

2. 1. 1. *Dialyse*

Depuis les travaux d'OSBORNE (1907), il est classique de séparer les albumines (solubles dans l'eau) des globulines (insolubles dans l'eau) par simple dialyse contre l'eau. Nous nous limiterons donc à relever ici les objections qui ont pu être faites à cette technique.

— JENSEN (1953) montre que le surnageant après dialyse d'un extrait salin contient des constituants dont les constantes de sédimentation sont celles des α, β et γ globulines (orge).

— POOL et SHOOTER (1955 *b*) décèlent également dans l'extrait aqueux (après dialyse) des fractions de mobilité électrique semblable à celles des α, β et γ globulines (orge), ce que AYRAPAA et NIHLEN (1954) avaient déjà signalé au cours d'une étude sur le malt.

— Remarquant des pertes au cours de la dialyse de certaines fractions protéiques de l'orge (fraction précipitée par $(NH_4)_2SO_4$ 0,7 M), POOL et SHOOTER (1955 *b*) supposent qu'elles sont dues à une cellulase, présente dans la préparation, qui attaquerait les parois des sacs de dialyse et rendrait ceux-ci perméables aux protéines cette constatation conduit ces auteurs à changer ceux-ci toutes les douze heures.

— CRAINE et FAHRENHOLTZ (1958) notent que l'instabilité des extraits aqueux de maïs, provoquée par abaissement de la force ionique et par un repos prolongé au froid, perturbe le fractionnement qui s'opère durant la dialyse.

— La teneur en protéines (N × 5,7) des préparations isolées est faible : 50 p. 100 pour les albumines du blé et 85 p. 100 pour les globulines correspondantes (FEILLET, 1965). Pour l'orge, KATAOKA (1963) trouve respectivement 54,5 p. 100 et 87 p. 100. Le fait qu'il s'agit de préparations isolées à l'état brut explique la pauvreté en azote des albumines, mais le matériel ainsi obtenu rend bien compte des différents complexes dans lesquels les protéines sont engagées.

Rappelons enfin, pour mémoire, que cette technique permet d'éliminer les sels et les substances diffusibles contenues dans les extraits, de sorte qu'elle fait le plus souvent suite aux méthodes décrites dans les paragraphes suivants.

2. 1. 2. *Relargage*

Le pouvoir précipitant des sels neutres à concentration élevée a souvent été mis à profit pour purifier et fractionner les protéines (technique du relargage). COHN (1925) a en effet montré que la précipitation saline dépendait du sel utilisé, de sa concentration, du pH et de la température, ainsi que de la nature de la protéine. QUENSEL (1942) est apparemment le premier à appliquer cette technique au fractionnement des protéines des céréales. Cet auteur précipite les globulines de l'orge à différentes concentrations en sulfate d'ammonium : la fraction insoluble à 15 p. 100 de saturation [1], solubilisée dans un tampon phosphate (pH = 7), NaCl M, puis précipitée à 7,5 p. 100 de saturation est très enrichie en bêta-globuline ; celle précipitant entre 15 p. 100 et 40 p. 100 est polydispersée et mal définie ; celle précipitant entre 40 p. 100 et 70 p. 100 contient les α- et β-globulines et des traces de δ-globulines.

[1] Le degré de saturation dont il est fait état est égal au rapport de la quantité de $(NH_4)_2SO_4$ ajouté à celle qu'il aurait fallu utiliser pour obtenir une solution saturée.

Pour cette raison, sans doute, les protéines de l'orge ont été les plus étudiées par relargage. DANIELSON et SANDEGREN (1947), KENT et MACHEBŒUF (1949), SCRIBAN (1951), BISERTE et SCRIBAN (1953), JENSEN (1953), POOL et SHOOTER (1955 *b*), DJURTOFT (1961), KATAOKA (1963) apportent des modifications de détail (nature du tampon d'extraction, concentration en sulfate d'ammonium ...) au protocole général de QUENSEL, de sorte que les extraits salins d'orge sont fractionnés en de

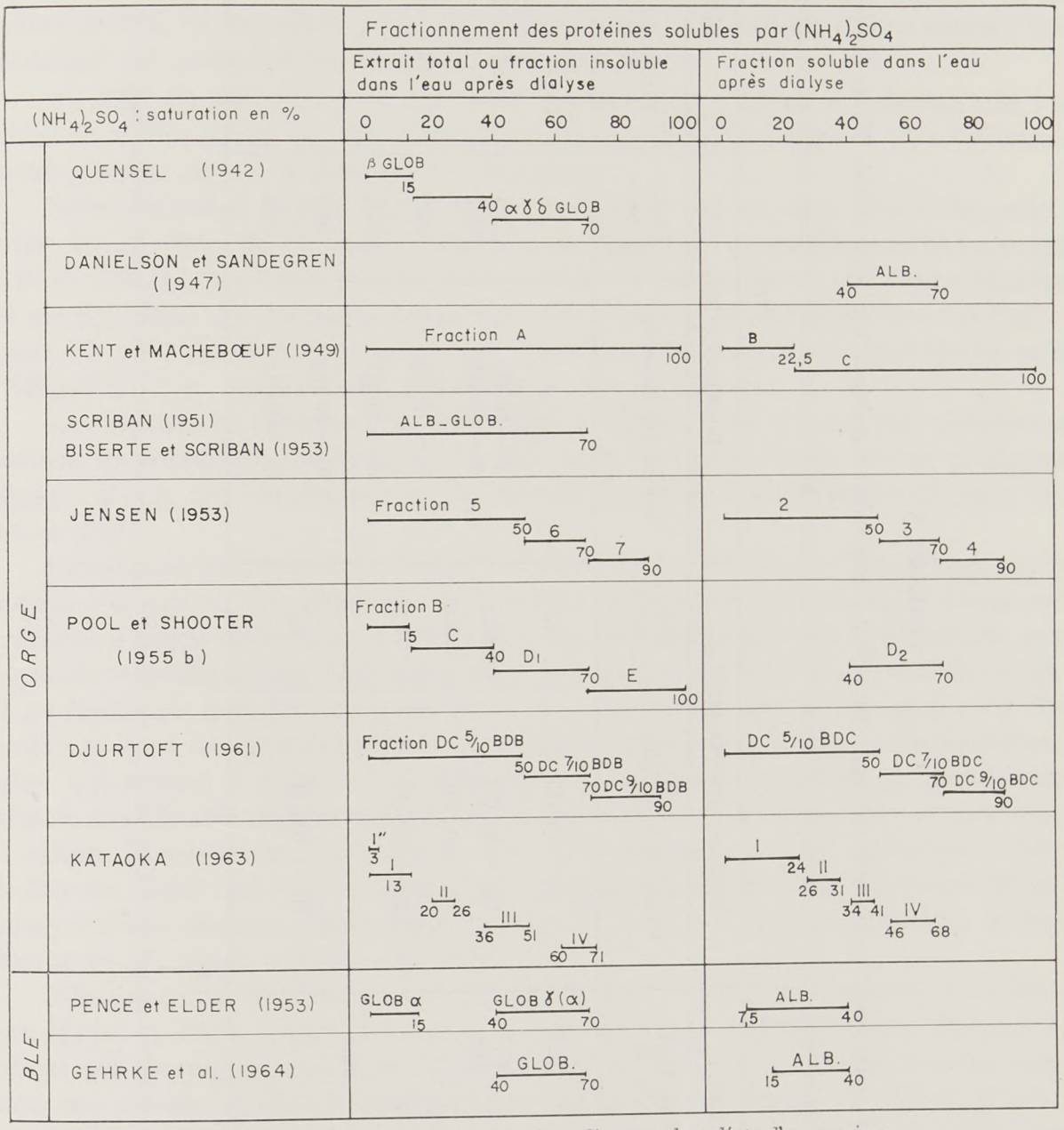


FIG. 1 — *Fractionnement des extraits salins par le sulfate d'ammonium. Selon POOL et SHOOTER* (1955 b), *modifié.*

très nombreux groupes de constituants selon des critères apparemment arbitraires, ce qui rend très difficiles les comparaisons entre les travaux de ces auteurs. POOL et SHOOTER (1955 *a*) ont eu le mérite de regrouper tous ces résultats dans un même tableau, de manière à établir une correspondance entre les fractions ainsi isolées. Nous avons rapporté en partie celle-ci (fig. 1), en y ajoutant certains des travaux

TABLEAU 5

Teneur en protéines des préparations isolées par relargage au sulfate d'ammonium : précipité total (T), soluble (S) ou insoluble (I) après dialyse.

Blé		Orge					
PENCE et ELDER (1953)		POOL et SHOOTER (1955 *b*)		DJURTOFT (1961)		KATAOKA (1963)	
Nature des produits	Prot. % m. s.	Nature des produits	Prot. % m. s.	Nature des produits	Prot. % m. s.	Nature des produits	Prot. % m. s.
0 — 7,5 (T)	82,7	0 — 15 (T)	66,7				
7,5 — 40 (S)*	96,3					0 — 24 (S)	77,5
7,5 — 40 (I)*	87,2	15 — 40 (T)	83,2	0 — 50 (S)	75,8	26 — 31 (S)	80,4
		40 — 70 (S)	90,1	0 — 50 (I)	66,7		
				50 — 70 (S)	75,2	46 — 68 (S)	77,5
		40 — 70 (I)	77,5				
				50 — 70 (I)	75,8		
40 — 90 (T)	23,9						
				70 — 90 (S)	59,3		
		70 — 100 (T)	0,6				
				70 — 90 (I)	69,0		

* Double précipitation.

sur l'orge postérieurs à cette mise au point, ainsi que d'autres concernant le blé (PENCE et ELDER, 1953 ; GEHRKE et *al.*, 1964).

KATAOKA (1963) trace les courbes de relargage des albumines et des globulines de l'orge en milieu neutre ou légèrement acide et tire les conclusions suivantes :

— les globulines précipitent plus rapidement que les albumines ;

— albumines et globulines sont presque totalement précipitées à $(NH_4)_2SO_4$ 3 M.

— la courbe de relargage des albumines ne présente de point d'inflexion ni en milieu neutre, ni en milieu acide ; il doit donc être très difficile de fractionner ces protéines par précipitation au sulfate d'ammonium ;

— celle des globulines, au contraire, possède 4 ou 5 points d'inflexion très visibles en milieu neutre (et non à un pH acide), ce qui laisse supposer un fractionnement possible de ces globulines par relargage.

Selon PENCE et ELDER (1953), et au vu de la teneur en azote amidé des précipités, les gliadines du blé seraient totalement éliminées d'un extrait salin en amenant celui-ci à $(NH_4)_2SO_4$ 7,5 p. 100. Si GEHRKE et *al.* (1964) montrent par électrophorèse en gel d'amidon qu'une partie importante des gliadines est éliminée dans ces conditions, il n'en subsiste pas moins une grande quantité qui n'est précipitée qu'à $(NH_4)_2SO_4$ 15 p. 100 avec des albumines et des globulines.

Les teneurs en protéines des préparations isolées (tabl. 5) sont très différentes suivant les conditions d'isolement : la plus riche est l'albumine de PENCE et ELDER (1953) ; 96,3 p. 100 ; la plus pauvre, la fraction 70-100 de POOL et SHOOTER (1955 *b*) : 0,6 p. 100.

Confirmant les travaux de BISERTE et SCRIBAN (1953), POOL et SHOOTER (1955 *b*) notent que 52,6 p. 100 seulement de l'azote contenu dans l'extrait salin d'orge est précipité à pleine saturation en $(NH_4)_2SO_4$, l'azote restant soluble correspondant aux peptides et acides aminés dialysables ainsi qu'à de gros polypeptides non dialysables. Il est également possible, ainsi que BELL (1963) le signale pour le blé, qu'il y ait des protéines dont les caractéristiques de solubilité soient tout à fait exceptionnelles ; selon cet auteur, il existerait en effet dans la farine un complexe glycoprotéique soluble dans l'acide trichloracétique. Il est probable qu'il demeure aussi soluble dans le sulfate d'ammonium à saturation. Une telle conclusion est en accord avec celle de HOLME (1962) qui ne peut obtenir par relargage des pentosanes totalement débarrassés d'azote (ceux-ci contiennent toujours de 5 à 15 p. 100 de protides), ce que PENCE et *al.* (1950) avaient déjà noté.

S'inspirant des méthodes d'extraction continue décrites par DESREUX et GHUYSEN (1951) et ZAHN (1952), RONDELET et LONTIE (1953) précipitent par $(NH_4)_2SO_4$ saturé, sur un support inerte, les protéines solubles de l'orge, introduisent le mélange dans une colonne et éluent l'ensemble par une solution de teneur en sulfate décroissante. Ils isolent ainsi 4 groupes de constituants dont les sommets des pics d'élution correspondent respectivement à un pourcentage de saturation en $(NH_4)_2SO_4$ de 59, 36, 20 et 14. Il ne semble pas que cette étude ait été poursuivie. Signalons, enfin, qu'après avoir montré que la presque totalité des albumines était précipitée par l'acétate de cadmium ($Cd(CH_3COO)_2$ M/20 — pH = 8,3), ces mêmes auteurs (RONDELET et LONTIE, 1955) réalisent un travail comparable mais en utilisant ce sel. Le fractionnement est alors réalisé soit par modification du pH, soit par augmentation de la force ionique, soit par variation simultanée de ces 2 facteurs.

2. 1. 3. *Solvants organiques*

On sait que les solvants organiques miscibles à l'eau précipitent les protéines de leur solution.

S'inspirant de la méthode mise au point par COHN et *al.* (1950) pour les protéines sériques, POOL et SHOOTER (1955 *c*) ont isolé 4 fractions à partir d'un extrait salin d'orge ; à cet effet, ces auteurs ont fait varier la force ionique et le pH de solutions salines préalablement portées à une concentration de 20 p. 100 en éthanol.

Les résultats obtenus sont résumés tableau 6.

TABLEAU 6

Fractionnement des protéines de l'orge par l'éthanol selon POOL *et* SHOOTER (1955 *c*). *Caractéristiques des fractions isolées.*

Milieu de précipitation		NaCl 0,2 M — Éthanol 20 p. 100 ; — 5°			
	Na^+	0,04 M	0,04 M	0,04 M	0,04 M
	Zn^+	—	0,02 M	0,02 M	0,02 M
	pH	5,2	5,2	7,5	9,0
Fractions		I	II	III	IV
Propriétés des fractions isolées	Protéines p. 100 m. s.	84,9	58,7	18,8	2,3
	Sucres trouvés après hydrolyse	Glucose (Xylose) Arabinose	Glucose (Xylose) (Arabinose) (Galactose)	Glucose Xylose Arabinose Galactose	Glucose Xylose Arabinose Galactose
	Mobilité électrophorétique apparente des composants trouvés dans les fractions (pH = 7,70) 10^{-5} cm^{-2} sec^{-1} $volt^{-1}$	— 11,9	— 12,2	—	—
		—	10,9	—	—
		(6,7)	(7,0)	—	—
		6,0	—	— 6,0	— 5,7
		5,2	—	—	—
		4,6	*4,6*	—	—
		(*3,7*)	*3,8*	—	—
		(2,9)	(3,0)	—	—
		2,1	2,4	—	—
		—	(1,7)	—	—
		—	0	0,5	0,5
		+ 0,3	—	+ 0,5	—
		—	+ 1,8	—	—

Il ressort de ce travail que la majorité des protéines précipite dans les deux premières fractions alors que la quatrième est particulièrement riche en polysaccharides. Par ailleurs, les fractions isolées demeurent très hétérogènes en électrophorèse.

Cette technique semble donc permettre davantage une purification des extraits (élimination des polysaccharides) qu'un fractionnement des protéines solubles.

2. 2. Purification et fractionnement par des méthodes physico-chimiques

Les biochimistes ont dû faire appel aux techniques beaucoup plus fines que sont l'ultracentrifugation, l'électrophorèse et la chromatographie pour préciser l'hétérogénéité des albumines et des globulines et pour tenter la purification éventuelle de certains constituants.

Nous nous proposons de rapporter dans ce paragraphe les résultats auxquels ont conduit ces trois groupes de méthode.

2. 2. 1. *Ultracentrifugation*

Les travaux de Quensel (1942) sur l'orge demeurent à la base de toutes les études qui leur ont fait suite : déterminant les constantes de sédimentation des globulines de l'orge, cet auteur a pu distinguer dans celles-ci 4 protéines distinctes : α- (2,49 S), β- (6,21 S), γ- (8,30 S) et δ-globulines (12,0 S).

Poursuivant ces recherches sur d'autres céréales, Saverborn et *al.* (1944), puis Danielsson (1949) ont montré que les composants β et δ seraient caractéristiques de l'orge alors que les globulines α et γ seraient également présentes dans les blés tendres, l'avoine, le maïs et le seigle (tabl. 7).

Ces fractions sont différemment réparties à l'intérieur du grain. Les recherches entreprises sur l'orge ont montré en effet à ces mêmes auteurs que la γ-globuline n'existe que dans l'embryon et l'-αglobuline que dans le reste du grain.

D'après Pence et Elder (1953), et contrairement aux résultats de Danielsson, la δ-globuline serait également présente dans le blé.

Selon Pool et Shooter (1955 *b*), les α-globulines sont très hétérogènes de même que, mais à un degré moindre, les β- et les γ-globulines.

TABLEAU 7

Constante de sédimentation des globulines des céréales (Danielsson, 1949).

	Globulines présentes	Constante de sédimentation S
Orge	α β γ δ	2,5 6,2 8,3 12,0
Blé tendre	α γ	2,6 8,2
Maïs	α γ	2,5 8,2
Avoine	α γ	2,6 8,1
Seigle	α γ	2,6 8,5

Il est intéressant de noter ici l'isolement, réalisé par Coates et Simmonds (1961) sur DEAE — cellulose, de 2 protéines solubles du blé ayant des constantes de sédimentation respectivement égales à 5 S et 2 S. La fraction 5 S correspondrait à la γ-globuline (Pence et Mecham, 1962). En raison de la grande mobilité électrophorétique de la fraction 2 S et de sa richesse en acides aminés basiques, cette protéine doit également correspondre à une globuline (α-globuline).

DJURTOFT (1961), doutant de la nature globuline de ces fractions, préfère parler de α, β et γ-composants, de préférence à α, β et γ-globulines ; par ailleurs, il note l'existence d'un groupe de protéines de coefficient de sédimentation égal ou inférieur à 2,1 S qu'il dénomme < α-composant. Selon cet auteur, on peut isoler à partir de 1 000 g d'orge (m. s.) :

			P. 100
	3,38 g	d'α-composant (2,2-2,7 S)	55,4
	0,84 g	de β-composant (6,0-6,5 S)	13,8
	0,47 g	de γ-composant (7,9-8,5 S)	7,7
environ	0,1 g	d'albumine (4-5 S)	1,6
	1,3 g	de < α-composant ($\leqslant$ 2,1 S)	21,3
soit	6,1 g	au total	99,8

2.2.2. *Électrophorèse*

De très nombreuses études ont été consacrées au comportement électrophorétique des protéines des céréales. La majorité des techniques (électrophorèse en veine liquide ou en milieu stabilisé, immunoélectrophorèse, électrophorèse préparative) et des supports connus (papier, amidon, gel d'amidon, gel d'agar, gel de polyacrylamide) ont été utilisés. Les tampons les plus divers (véronal, cacodylate, *tris*-borate, acétate, lactate ...) recouvrant une gamme de pH comprise entre 2,15 et 11,6 ont été employés. Des extraits salins ou aqueux, de farines ou de grains broyés, des préparations purifiées par dialyse, relargage ou chromatographie ont été analysés. Il n'est donc pas surprenant que les résultats auxquels ces travaux ont abouti soient très divers et difficilement comparables. Pour tenter de clarifier notre exposé, nous décrirons successivement les études concernant le blé, l'orge, puis les autres céréales.

A — *Protéines du blé.*

On doit à LAWS et FRANCE (1948) la première séparation électrophorétique des protéines hydrosolubles du blé : celles-ci sont fractionnées en 3 constituants au moins par électrophorèse en veine liquide, en milieu acide (pH = 2,15) ou basique (pH = 9,10). C'est néanmoins à PENCE et ELDER (1953) que revient le mérite de la première étude systématique : par électrophorèse sur papier (pH = 6,0 ou 6,1 ; tampon cacodylate ; μ = 0,1 ou 0,2) ces auteurs identifient 6, puis 11 fractions (PENCE et ELDER, 1953 ; PENCE, 1953) dans des albumines purifiées par relargage au sulfate d'ammonium. PENCE (1953) précise que la résolution est meilleure dans une zone de pH comprise entre 6 et 8, l'abaissement ou l'augmentation de pH de part et d'autre de ces limites rendant difficile la mise en évidence de certaines fractions. Selon ce dernier auteur, il est possible de répartir ces 11 constituants protéiques en trois groupes en fonction de leur point isoélectrique :

le groupe α de pH_i 4,5-4,8 (α_1, α_2, α_3, α_4).
le groupe β de pH_i 4,9-5,8 (β_1, β_2, β_3, β_4).
le groupe γ de pH_i 6,5-6,8 (γ_1, γ_2, γ_3).

Cette hétérogénéité a été précisée par de très nombreux travaux :

— *en veine liquide,* WALDSCHMIDT-LEITZ et HOCHSTRASSER (1961) identifient 6 constituants dans les albumines ; COATES et SIMMONDS (1961) caractérisent 5 frac-

tions de mobilité respective 0,019 - 1,259- 2,653- 3,658- 5,364 10^{-5} cm^2 $volt^{-1}$ sec^{-1} dans un extrait pyrophosphate de farine (tampon soude-glycocolle ; pH = 9,98) ; KELLEY et KOENIG (1962) résolvent un extrait salin (NaCl 0,1 M) de farine en 9 fractions au moins (tampon véronal ; pH = 8,6) ; l'albumine purifiée par le sulfate d'ammonium est fractionnée en 5 fractions en tampon lactate d'aluminium (pH = 3,0 ; μ = 0,1) par HOLME (1962). Ce même auteur sépare un extrait salin (0,1 M NaCl) en 5 fractions en milieu basique (tampon véronal ; pH = 8,5).

— *sur gel d'amidon*, la majorité des séparations ont été réalisées dans le tampon lactate d'aluminium (pH = 3,1), mis au point par JONES et *al.* (1959) pour l'étude des protéines du gluten : WOYCHIK et *al.* (1961 *a*) identifient 9 fractions « protéines solubles » dans un extrait aqueux de gluten ; ELTON et EWART (1962) dénombrent 8 constituants dans la zone de migration des albumines et 3 dans celles des globulines ; selon KAMINSKI (1962), des extraits aqueux et salins de farine seraient respectivement constitués de 22 et 23 fractions différentes, nombres qui rendent compte de la solubilité des gliadines dans ces milieux ; des résultats comparables sont décrits par GRAHAM (1963) et GEHRKE et *al.* (1964).

ABBOT (1964) réalise les meilleurs fractionnements à pH = 6,2 dans le tampon cacodylate 0,03 M. FEILLET et BOURDET (1964) et FEILLET (1965) préfèrent utiliser le tampon *tris*-borate d'ARONSSON et GRONWALL (1957) à pH = 8,9 ; dans ces conditions, les protéines du gluten ne migrent pas, de sorte que la vingtaine de constituants identifiés dans un extrait salin est de nature « albumines-globulines ».

ENARI et *al.* (1963 *a*), enfin, identifient une dizaine de fractions dans les seules protéines basiques du blé (migrant vers la cathode à pH = 8,4 ; tampon borate), ce que confirme MIKOLA (1965) par électrophorèse en *disque sur polyacrylamide*.

— *sur gel de polyacrylamide*, NIMMO et *al.* (1963) dénombrent de 15 à 17 fractions dans un extrait aqueux de farine (tampon cacodylate ; pH = 6,0-6,1) ; SAFONOV et SAFONOVA (1965) séparent de même les albumines en 11 fractions (à pH = 8,6) dont 4 migrent vers la cathode ;

— *sur gel d'agar*, GRABAR et *al.* (1962, 1965) décèlent 6 à 7 groupes de protéines dans des extraits salins (NaCl 0,5 M — pH = 7) de grains broyés ou de farine ; et 4 seulement dans des albumines purifiées selon PENCE et ELDER (1953).

Par contre, et selon ces mêmes auteurs, l'*analyse immuno-électrophorétique* met en évidence une dizaine de constituants dans les extraits salins.

B — *Protéines de l'orge.*

Moins étudiées que celles du blé, les protéines solubles de l'orge ont cependant fait l'objet d'un nombre important de travaux.

Par électrophorèse en *veine liquide*, SCRIBAN (1951) a identifié 3 composants (A', B'_1 et B'_2) dans un extrait salin d'orge (tampon phosphate ; pH = 7) : A', de mobilité égale à 4,3 × 10^{-5} $cm^2/sec^{-1}/volt^{-1}$, représente 75 p. 100 des protéines totales ; B'_1 et B'_2 sont de faible mobilité. RONDELET et LONTIE (1955) décomptent 7 (pH = 4,3) ou 3 (pH = 8,8) composants dans les albumines ; par contre, WALDSCHMIDT-LEITZ et HOCHSTRASSER (1961) distinguent jusqu'à 7 fractions à pH = 7,9 (tampon veronal) dont les mobilités sont données dans le tableau 8.

Par ailleurs, KATAOKA (1963) n'identifie que 2 (tampon véronal ; pH = 8,1) ou 3 fractions (tampon glycocolle ; pH = 2,5) dans une préparation purifiée d'albumine.

Dans les mêmes conditions, les globulines sont séparées en 3 (pH = 8,1) ou 4 (pH = 2,5) constituants.

BISERTE et SCRIBAN (1953) sont les premiers à appliquer l'électrophorèse *sur papier* à l'étude des protéines de l'orge ; en 1959, WALDSCHMIDT-LEITZ (1959) frac-

TABLEAU 8

Mobilité électrophorétique des albumines de l'orge selon WALDSCHMIDT-LEITZ *et* HOCHSTRASSER (1961).

Fraction	Mobilité (10^{-5} cm^2 volt^{-1} sec^{-1})
α_1	+ 7,6
α_2	+ 6,6
α_3	+ 5,5
β_1	+ 3,8
β_2	+ 3,2
β_3	+ 2,1
γ	— 0,4

tionne sur ce support un extrait salin d'orge en 7 composants. Selon ENARI et *al.* (1962 *a*), les protéines basiques se résolvent en 4 fractions qui sont apparemment identiques aux 4 constituants cathodiques décelés dans un extrait d'orge total (ENARI et *al.* 1961) (pH = 8,6 ; tampon véronal).

Étudiées en électrophorèse sur *gel d'amidon*, les albumines sont fractionnées par ELTON et EWART (1962) en 8 constituants tandis que les globulines demeurent homogènes (pH = 3,3 ; tampon lactate d'aluminium) ; la résolution est bien supérieure en milieu alcalin : les seules protéines basiques (30 p. 100 des protéines solubles totales) sont en effet séparées par ENARI et *al.* (1962 *a*, 1963 *a*) en 16 fractions dont 2 migrent vers l'anode (pH = 8,4).

Une étude très complète de ces protéines basiques a été réalisée par MIKOLA (1965) par *électrophorèse en disque* selon ORNSTEIN et DAVIS (1962). Après avoir décrit une nouvelle méthode d'électrophorèse applicable à l'étude des protéines de point isoélectrique supérieur à 8,6, MIKOLA décèle dix bandes dont la majorité doit correspondre à des protéines existant à l'état natif dans le grain ; par ailleurs cet auteur montre que les protéines basiques migrent dans le même ordre en gel d'amidon et de polyacrylamide, exception faite des 4 fractions les plus rapides (B_{1-4}) dans ce dernier support.

Sur *gel d'agar* (pH = 8,2 ; tampon véronal), GRABAR et *al.* (1962, 1965) fractionnent un extrait salin en 6 ou 7 constituants, mais les techniques d'*immunoélectrophorèse* conduisent ces mêmes auteurs à caractériser 17 à 22 arcs de précipitation, tandis que PRÉAUX et *al.* (1963) en décèlent 12 seulement (pH = 8,6 ; tampon *Tris*) et HILL et DJURTOFT (1964) 21 (pH = 8,6 ; tampon véronal). Ces derniers se sont efforcés d'établir un lien entre leurs résultats et la nomenclature classique de QUENSEL (1942) ; ils ont pu montrer que les α et γ globulines étaient respectivement identiques aux fractions *l* et *i* de leur propre terminologie ; de plus les fractions *t* et *u* correspondraient aux albumines de QUENSEL (4-5 S).

Dans un travail tout récent et très complet, DAUSSANT (1966 *b*) met cette technique à profit pour analyser des extraits salins d'orge et de malt (extrait phosphate de potassium 0,1 M et chlorure de sodium 0,4 M à pH = 6,6 après délipidation par l'acétone). Il dénombre 17 constituants dans une farine d'orge qu'il numérote de 1 à 17 de l'anode vers la cathode, et précise les propriétés de certains d'entre eux :

les fractions 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 13 apparaissent dans les albumines ;
les fractions 2, 4, 6, 10 et 12 apparaissent dans les globulines ;
la fraction 6 apparait dans l'hordéine ;
les fractions 10 et 13 sont des lipoprotéines ;
la fraction 13 a une activité peroxidasique ;
la fraction 8 a une activité β-amylasique ;
la fraction 9 est une estérase de faible activité ;
aucun arc ne présente d'activité α-amylasique.

L'extrait de malt se différencie principalement de l'extrait d'orge par la présence d'une fraction de type globuline possédant un fort pouvoir α-amylasique. DAUSSANT compare ensuite ses résultats à ceux de GRABAR et *al.* (1962) et de HILL et DJURTOFT (1964) et établit la correspondance entre les constituants tabl. 9).

L'immunoélectrophorèse a également été utilisée par NUMMI (cité par ENARI, 1965) pour caractériser les globulines séparées par filtration sur gel de Séphadex. La γ-globuline n'est constituée que de 2 fractions que l'on retrouve également dans les δ et β-globulines ; ces dernières possèdent un troisième constituant ; les α-globulines, enfin, sont formés d'une fraction électropositive et de trois électronégatives et n'ont aucune fraction en commun avec les β-globulines.

TABLEAU 9

Comparaison entre les terminologies de DJURTOFT *et* HILL (1964), GRABAR et *al.* (1962) *et* DAUSSANT (1966 *b*).
selon DAUSSANT (1966 *b*)

Auteurs	Correspondance entre les constituants décelés						
DJURTOFT et HILL (1964)	4	4	4 et 1		9	*r* et *s*	*t* et *u*
GRABAR et *al.* (1962)	B et C	D et D'	E_1	E_3	F	G	
DAUSSANT (1966 *b*)	5 et 6	7	11 et 12	14	13 et 15	16	17

C — *Protéines des autres céréales* (*avoine, maïs, riz, seigle, sorgho*).

Quelques travaux seulement ont été consacrés à l'étude des protéines solubles des céréales autres que le blé et l'orge.

Un extrait aqueux de *maïs* a été séparé en 5 fractions par FOSTER et *al.* (1950) par électrophorèse en veine liquide (pH = 10,3 ; tampon carbonate-bicarbonate) et en 6 constituants par CRAINE et FAHRENHOLTS (1958) (veine liquide ; pH = 8,6 ; tampon véronal) ; par contre, MERTZ et *al.* (1958) ne décompte que 4 constituants de mobilité respective 1,9 - 3,5 - 4,3 et 6,3 $\times 10^{-5}$ cm^2 volt^{-1} sec^{-1} dans un extrait salin

(veine liquide ; pH = 11,6 ; tampon glycocolle). Par électrophorèse sur papier, TSURKAN (1962) identifie 5 fractions dans les albumines et 2 ou 3 dans les globulines du Maïs (pH = 7,8 ; tampon glycocolle). Selon ALEXANDRESCU (1964), les protéines solubles du germe du maïs sont constituées de 4 composants au moins. Les albumines-globulines du maïs seraient cependant au moins aussi complexes que celles de l'orge et du blé puisque MIKOLA (1965) n'identifie pas moins de 10 fractions dans les protéines basiques. Curieusement ELTON et EWART (1962) ne décèlent aucune bande en gel d'amidon (pH = 3,3).

Les protéines solubles de l'*avoine* ont été d'abord étudiées par PADMOYO et HOGL (1962) par électrophorèse sur papier (pH = 10), puis en gel d'amidon par ELTON et EWART (1962) selon lesquels les albumines se résolveraient en 2 bandes, aucune protéine n'étant décelable dans la zone des globulines (pH = 3,3 ; tampon lactate d'aluminium). WALDSCHMIDT-LEITZ et ZWISLER (1963) séparent les albumines de l'avoine en 7 constituants (α_1, α_2, α_3, β_1, β_2, γ_1, γ_2) dont les plus importants quantitativement sont α_2, α_3 et γ_1 (pH = 7,9 ; tampon véronal). Contrairement aux autres céréales, et bien qu'ENARI et *al.* (1963 *a*) dénombrent 10 constituants dans les protéines basiques, MIKOLA (1965) n'en décèle que 5 sur polyacrylamide.

Selon ces mêmes auteurs, les protéines basiques du *seigle* seraient constituées d'une dizaine de fractions distinctes alors qu'ELTON et EWART (1962) n'avaient identifié que 6 constituants dans un extrait total (pH = 3,3 ; gel d'amidon). D'après SIMOVA et VESELY (1963) les albumines et les globulines du seigle sont respectivement constituées de 2 fractions ; par contre, KUCERA et FRANEK (1963) trouvent la globuline homogène aux pH supérieurs à 3,6.

Par électrophorèse sur papier, TSURKAN (1962) fractionne les albumines du *sorgho* en 5 constituants et les globulines en 3 (pH = 7,8 ; tampon glycocolle).

En gel de polyacrylamide, enfin, SILAEV et *al.* (1965) séparent les albumines du *riz* en 9 à 11 fractions dont 2 migrent vers la cathode (pH = 8,65 ; tampon *Tris*-citrate) et les globulines en 5 fractions dont 3 sont électronégatives.

D — *Électrophorèse préparative.*

Mettant à profit le pouvoir séparateur élevé de l'électrophorèse, quelques auteurs ont tenté des fractionnements à l'échelle préparative.

S'inspirant de la méthode décrite par GRASSMANN (1951), RONDELET et LONTIE (1953) séparent les albumines et les globulines de l'orge par électrophorèse continue sur papier (pH = 8,5 ; tampon glycocolle) ; le diagramme d'élution (mesures faites à 278 mμ) est sensiblement comparable à la courbe d'électrophorèse obtenue avec l'appareil de Tiselius, mais aucune détermination n'est faite sur les fractions isolées.

De même, mais en milieu acide (tampon acétique-formique) un extrait aqueux de farine de blé est fractionné par STROBEL et HOLME (1964 *a* ; 1964 *b*) : ces auteurs isolent ainsi 4 groupes de constituants protéiques (P_1, P_2, P_3 et P_4, représentant respectivement 4, 9, 46 et 4 p. 100 du matériel déposé) et une fraction glucidique restant au départ et non souillée de protéines (37 p. 100 du matériel déposé).

Sur colonne de Géon (poudre de chlorure de polyvinyle), et selon la technique de FLODIN et PORATH (1954) pour l'amidon, PRÉAUX et *al.* (1963) fractionnent les albumines de l'orge (pH = 4,6 ; tampon acétate) en 7 à 8 groupes de constituants ; les fractions recueillies sont encore hétérogènes à l'électrophorèse et à l'immuno-

électrophorèse en gélose (pH = 8,6) ; les polysaccharides ne se retrouvent que dans les constituants de faible mobilité, et encore en très faible quantité.

WALDSCHMITZ-LEITZ et HOCHSTRASSER (1961) isolent par électrophorèse préparative en veine liquide les fractions constitutives des albumines de l'orge et du blé (6 à 7) en quantité suffisante pour en faire l'analyse en acides aminiés.

ABBOT et JOHNSON (1966) combinent la filtration sur gel de Sephadex et l'électrophorèse en gel d'amidon pour isoler une fraction albumine du blé électrophorétiquement pure ; le produit final obtenu reste néanmoins souillé de glucides et probablement de lactate d'aluminium, dont l'élimination par dialyse est très difficile.

E — *Conclusion.*

En conclusion de cette étude sur le comportement électrophorétique des protéines solubles des céréales, il est possible de dégager les faits essentiels suivants :

— l'électrophorèse en gel d'amidon ou de polyacrylamide et l'immuno-électrophorèse sont les techniques les mieux adaptées et les plus intéressantes de sorte qu'elles sont maintenant presque uniquement utilisées ;

— l'hétérogénéité des protéines solubles apparaît plus nettement en milieu basique qu'en tampon acide ; celui-ci est néanmoins plus apte à différencier les prolamines des albumines-globulines ;

— les protéines solubles de l'orge (une vingtaine de constituants) et celles du blé (une quinzaine) apparaissent les plus complexes. Bien qu'un plus petit nombre de fractions ait été caractérisé dans les autres céréales, en raison sans doute du peu d'études dont elles ont été l'objet, il est probable, eu égard aux travaux d'ENARI et *al.* (1963) et de MIKOLA (1965) sur les fractions basiques, qu'elles sont aussi très hétérogènes ;

— les tentatives d'électrophorèse préparative ouvrent une voie très intéressante. Il semblerait donc souhaitable d'orienter les travaux dans ce sens en adaptant ces méthodes à l'électrophorèse sur gel d'amidon ou de polyacrylamide.

2.2.3. *Chromatographie*

Parallèlement aux fractionnements réalisés par électrophorèse, qui sont plus qualitatifs que préparatifs ou quantitatifs, les céréalistes ont tenté d'isoler les fractions constitutives des protéines solubles en s'aidant des nouvelles techniques chromatographiques, sur échangeur d'ions cellulosiques selon SOBER et PETERSON (1954), ou sur gel de Sephadex selon PORATH et FLODIN (1959).

A — *Chromatographie sur échangeur d'ions cellulosiques.*

α) *Sur DEAE-cellulose.*

Par chromatographie sur DEAE-cellulose, COATES et SIMMONDS (1961) isolent 6 fractions A, D, E, F, J et K à partir d'un extrait pyrophosphate de farine de blé :

La fraction A n'est pas fixée sur la colonne (tampon glycocolle soude ; 0,006 M ; pH = 9,5) ; les pics D, E et F sont élués par un gradient linéaire de NaCl (0 à 0,3 M) dans le même tampon ; le pic J sort avec CH_3COOH 0,05 N et le pic K avec NaOH 0,1 N.

SIMMONDS (1963) améliore ce fractionnement en régularisant le débit avec une micropompe ; il obtient ainsi 8 constituants, les pics D, E et F se résolvant en 5 fractions D, E, G, H et F. Rechromatographiés, les pics D, E et F sont homogènes en électrophorèse en veine liquide. Par ailleurs, D et E ne possèdent qu'un seul acide

N-terminal, la sérine ; F en contient 2, la sérine et la thréonine. GRAHAM (1963) montre que ces fractions sont néanmoins très hétérogènes en électrophorèse en gel d'amidon.

Un extrait aqueux de farine est fractionné en 11 constituants par NIMMO et *al.* (1963).

La fraction 1 n'est pas fixée (tampon glycocolle 0,01 M) ; les 8 pics suivants sont élués par un gradient linéaire de KH_2PO_4 (0 à 0,1 M ; pH = 6,8) dans le même tampon. Le pic 10 est obtenu en accroissant la vitesse du gradient ; le pic 11 est élué par KH_2PO_4 1 M.

La première fraction représente le 1/3 des protéines déposées, et semble correspondre à la fraction A de COATES et SIMMONDS (1961) ; elle est riche en glucide. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide montre qu'elle est constituée de plusieurs composants très électropositifs. Quoique les autres pics demeurent très hétérogènes, on constate un enrichissement en certaines fractions. Ces auteurs notent enfin que les pics 10 et 11 réunis ont une teneur en « 1/2 cystine » égale au quart de celle des autres pics.

Selon GRABAR et *al.* (1962) un extrait salin de farine de blé est fractionné en 3 pics simples et reproductibles : les protéines sont déposées sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée par un tampon phosphate (pH = 6,8 ; $\mu = 0,02$) puis éluées à pH constant par augmentation de la force ionique (de 0,02 à 0,4) ; les fractions a_2 (pic n° 2 — élué à $\mu = 0,065$) et a_1 (pic n° 3 — élué à $\mu = 0,2$) seraient presque pures tant du point de vue électrophorétique (en gélose) qu'immunochimique ; la mobilité respective de ces deux constituants est — 6,7 et 4,9 10^{-5} cm^2 sec^{-1} $volt^{-1}$ (calculée par référence à la sérum-albumine humaine en tampon véronal 0,05 M ; pH = 8,2).

KELLEY (1964) isole une protéine soluble purifiée (à 96 p. 100) par précipitation dans un tampon phosphate et chromatographiée sur DEAE-cellulose ; cette fraction a une mobilité de $4,7 \times 10^{-5}$ cm^2 $volt^{-1}$ sec^{-1} (en tampon véronal ; pH = 8,6 ; $\mu = 0,1$) et un point isoélectrique de 6,2 environ. Sa composition en acides aminés diffère de celle d'un extrait aqueux de farine et de celle du gluten (cf. tabl. 14). Son volume spécifique partiel est 0,722 ; son poids moléculaire environ 75 000. Cette protéine étant la seule sur laquelle des déterminations physico-chimiques aient été faites, nous en donnons de manière détaillée les conditions d'isolement :

Un extrait de farine est amené à 0,95 M tampon phosphate (pH = 6,8) ; le précipité obtenu est repris par NaCl 0,1 M, puis purifié par précipitation fractionnée entre 0,25 et 0,6 M tampon phosphate ; l'insoluble 0,6 M est dialysé contre un tampon borate 0,005 M — pH = 9,1, puis déposé sur une colonne de DEAE équilibrée par le même tampon ; après lavage de la colonne, le constituant recherché est élué par un tampon borate 0,05 M contenant NaCl 0,6 M. Une dernière purification est réalisée par rechromatographie de cette dernière fraction en éluant suivant un gradient 0 à 0,3 M NaCl en tampon borate 0,05 M.

Des travaux identiques ont été entrepris sur l'orge. ENARI et MIKOLA (1961 *a*) montrent que le 1/3 des albumines de l'orge (stabilisés par l'E.D.T.A. et purifiées par filtration sur Sephadex G 25) n'est pas adsorbé sur la DEAE-cellulose à pH = 7,5 (tampon phosphate) ; les protéines fixées dans ces conditions se résolvent en 15 pics par passage d'un gradient croissant de phosphate (0,005 à 0,5) et décroissant de pH 7,5 à 3. Par élution discontinue (tampon phosphate 0,1 M pH = 7,0, puis 0,5 M, pH = 4,0), ces mêmes auteurs isolent 3 fractions bien différenciées (tabl. 10).

Par électrophorèse sur papier, les protéines basiques se résolvent en 3 fractions cathodiques (pH = 8,6) ; les protéines neutres en 4 ; les acides en 2.

Dans des conditions expérimentales très voisines, MAZERON et *al.* (1965 *b*, 1966) isolent 50 p. 100 de protéines neutres, 40 p. 100 de protéines basiques et 10 p. 100 seulement de protéines acides ; l'électrophorèse en gélose décèle respectivement 4,8 et 2 fractions dans ces trois groupes protéiques.

TABLEAU 10

Fractionnement des albumines de l'orge sur DEAE-cellulose en tampon phosphate
Les activités enzymatiques sont exprimés en unité relative
(selon ENARI et MIKOLA, 1961 *a*)

Fraction	Tampon d'élution	Nature	Protéine récupérée p. 100 Albumine déposée	β-amylase	Activité protéolytique
I	Non fixé	basique	30	0	7,5
II	0,1 M — pH = 7,0	neutre	41	114	2,5
III	0,5 M — pH = 4,0	acide	19	7	0,0

Comparant les albumines de plusieurs céréales, ENARI et MIKOLA (1961 *b*) montrent que les diagrammes d'élution obtenus à partir de l'orge, du seigle, de l'avoine du blé d'hiver et du blé de printemps sont presque identiques. La proportion de protéines basiques est néanmoins plus faible chez l'avoine (20 p. 100) que dans les autres espèces (blé d'hiver 36 p. 100, blé de printemps 33 p. 100, seigle et orge 32 p. 100). MIKOLA (1965) indique des teneurs relatives voisines, sauf pour le seigle : 1 pour le blé et l'orge, 0,5 pour l'avoine, 0,25 pour le maïs et le seigle (valeurs obtenues par électrophorèse en disque sur polyacrylamide).

Selon KATAOKA (1963), les albumines et les globulines de l'orge possèdent des diagrammes d'élution caractéristiques ; la plus grande partie des albumines est très rapidement éluée, ce qui montre la prédominance dans cette fraction de protéines chargées positivement.

PRÉAUX et *al.* (1963) opèrent en tampon borate (pH = 8,6 ; μ = 0,05). Les polysaccharides ne sont pas retenus et sortent de la colonne avec le front du tampon. Les albumines, éluées à μ = 0,05 par variation discontinue de pH (tampon phosphate : pH = 6,7 et 6,1 ; acétate pH = 5,6, 5,3, 4,8, 4,4 et 4,0) sont fractionnées en 10 pics distincts, mais les protéines isolées ne migrent que difficilement en gel de gélose (pH = 8,6). Selon ces auteurs, le pH élevé auquel s'est opéré la fixation des albumines sur l'échangeur provoquerait leur dénaturation ; les albumines de l'orge seraient donc moins stables que celles du blé puisque celles-ci (GRAHAM, 1963) se comportent normalement en gel d'amidon après chromatographie sur DEAE-cellulose selon SIMMONDS (1961) à pH = 9,5.

β) *Sur CM-cellulose.*

Constatant par électrophorèse les insuffisances du fractionnement de COATES et SIMMONDS (1961) (bandes électrophorétiques communes à plusieurs pics) OH et GEHRKE (1965) réalisent le fractionnement des protéines du blé solubles dans NaCl 0,1 M sur CM-cellulose.

La colonne de CMC est équilibrée par un tampon acétate de sodium (0,005 M ; pH = 3,5); l'élution est réalisée par passage ssuccessifs de 7 tampons de concentration en NaCl variant de 0,0 à 0,7.

Six pics sont recueillis : le premier correspond à une fraction non fixée sur la colonne, riche en glucides, et ne donnant aucune bande en électrophorèse. Les 5 autres pics représentent respectivement les protéines de la « zone diffuse », les albumines lentes, les globulines lentes, les protéines de base et les albumines rapides (suivant la nomenclature de GEHRKE et *al.*, 1964).

DESCHREIDER (1964 *b*) caractérise 7 groupes de protéines dans un extrait aqueux de farine (colonne équilibrée dans un tampon acétate à pH = 4,1 ; élution par des tampons successifs de forces ioniques et de pH croissant), mais son fractionnement est apparemment moins efficace que celui de OH et GEHRKE (1965).

La chromatographie sur CM-cellulose permet à GIJSEL et *al.* (1961) et à PRÉAUX et *al.* (1963) de fractionner les albumines de l'orge en 9 à 10 groupes de composants protéiques et d'en séparer les polysaccharides, ces derniers n'étant pas fixés en tampon acétate (pH = 4,0 ; μ = 0,025). Les différents pics sont obtenus par passages successifs de tampons acétate (pH = 4,4 ; 4,9 ; 5,3 et 5,6), phosphate (pH = 6,1 et 6,8) et borate (pH = 8,6) ; les protéines ainsi isolées, quasiment débarrassées des glucides et des polyphénols, sont encore hétérogènes en électrophorèse et en chromatographie.

MCGUIRE et *al.* (1960) fractionnent de même les protéines du maïs solubles dans l'eau (appelées « Globulines » par les auteurs) après élimination des phytates par passage des extraits aqueux sur Dowex 1.

La colonne est équilibrée par CH_3COOH 1 p. 100 (pH = 2,8); les protéines sont éluées par des tampons de force ionique croissante à pH constant (0,01 ; 0,02 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 et 0,5 M NaCl ; pH = 2,8).

Ces auteurs isolent ainsi 8 pics dont 4 plus importants ; le premier, non fixé, contient une fraction protéique souillée de pigments jaunes et d'acides nucléiques et représente 43 p. 100 du matériel azoté.

CLAYTON (1966) utilise successivement la CM-cellullose et la DEAE-cellullose pour fractionner un extrait pyro-phosphate de blé, les protéines non fixées sur l'échangeur cationique (pH = 5,5) étant déposées sur l'échangeur anionique (pH = 7,0).

B — *Chromatographie sur gel de Sephadex.*

La chromatographie sur gel de Sephadex, ou chromatographie d'exclusion-diffusion, a été utilisée ces toutes dernières années pour fractionner les protéines solubles de l'orge et du blé.

On sait que les gels de Sephadex jouant le rôle de tamis moléculaire, les substances constitutives d'un mélange sortent de la colonne par ordre de poids moléculaire décroissant ; en fait, et comme il se dégagera des travaux rapportés ci-dessous, les paramètres du fractionnement sont plus nombreux, les gels de dextrane possédant quelques groupes ionisables et jouant donc également le rôle d'un échangeur d'ions.

Par filtration sur Sephadex G 25, G 50 ou G 75, NUMMI et ENARI (1962) séparent les albumines de l'orge solubles dans l'eau en 2 groupes de protéines qui se résolvent respectivement en 2 et 4 fractions protéiques distinctes par électrophorèse sur papier. ENARI et *al.* (1963 *b*) identifient 6 pics (sur G 100) à partir des mêmes albumines,

mais le fractionnement n'est pas très net. Minimisant les effets d'échange d'ions en utilisant des solutions de force ionique élevée, NUMMI (1963 *a*) fractionne les globulines de l'orge (fraction soluble dans NaCl 2,5 p. 100 après épuisement de l'orge broyé par l'eau) en 10 composants (dont 6 principaux et 4 mineurs) sur Sephadex G 100 à pH = 7,5. Toutes les fractions obtenues se révèlent très hétérogènes en gel de polyacrylamide, ce qui conduit l'auteur à supposer l'existence de 22 à 43 constituants différents dans son extrait initial. Ces fractions sont examinées par ultracentrifugation [1] (NUMMI, 1963 *b*) et comparées aux globulines de QUENSEL (1942). Le tableau 11 ci-dessous montre qu'il y a une bonne correspondance dans les valeurs trouvées par les deux auteurs et que l'élution s'effectue bien dans l'ordre des poids moléculaires décroissants :

TABLEAU 11

Comparaison entre les globulines de l'orge isolées sur Sephadex et celles caractérisées par QUENSEL (NUMMI, 1963 *b*)

	Fractions Sephadex (NUMMI, 1963 *b*)		Globulines QUENSEL (QUENSEL, 1942)	
	Nom	So	Nom	So
I	$\varepsilon + \delta$	10,4	δ	12,0
II	γ	8,1	γ	8,4
III	β	5,9	β	6,2
IV	α	2,6	α	2,5
V	α_1	2,4		
VI	α_2	non mesuré		

Étudiant par la même technique les fractions 0-15, 15-40 et 40-70 p. 100 de saturation en $(NH_4)_2SO_4$ de QUENSEL (1942), cet auteur souligne que la première contient toutes les β-globulines mais est souillée de α_1 - globulines, que la deuxième, très hétérogène, est surtout composée de α_1-globulines, et que la troisième est formée de ε, δ, γ, α et α_1-globulines, résultats qui précisent sans les infirmer ceux de QUENSEL.

DJURTOFT (1963) montre de même que les 4 fractions isolées à partir des albumines de l'orge sur Sephadex G 25 ont des constantes de sédimentation qui sont, par ordre d'élution, respectivement de 4,4, 3,0, 2,3 et 1,6.

Les protéines basiques de l'orge sont séparées par MIKOLA (1965) en 4 ou 6 pics par chromatographie sur Sephadex G 100 ou G 75 (en tampon phosphate 0.01 M ; pH = 7,5 ; 0,428 M NaCl). Les électrophorèses en disques sur polyacrylamide des fractions isolées montrent l'efficacité de la séparation ainsi réalisée. Les volumes d'élution relatifs des 10 protéines basiques indiquent que leur poids moléculaire est compris entre 45 000 et 12 000.

Parallèlement à ces travaux, PRÉAUX et *al.* (1963) ont testé l'efficacité des Sephadex G 25, G 50, G 75, G 100 et G 200, en milieu acide (tampon acétate de triéthylamine ; pH = 4,7 ; μ = 0,05) ou neutre (acétate d'ammonium ; pH = 6,98 ;

[1] Les 6 fractions étudiées ici ont été séparées à pH = 6,6 au lieu de 7,5.

$\mu = 0{,}005$) ; ils constatent que l'hétérogénéité des albumines de l'orge apparaît d'autant plus grande que la porosité du gel est plus élevée ; la sephadex G 200 conduit néanmoins à des pics trop étalés. De ce fait les meilleurs fractionnements sont obtenus sur Sephadex G 75 médium et G 100. La comparaison des résultats montre que des molécules de mobilité électrophorétique pratiquement identique (à pH = 8,6) se différencie par leur masse moléculaire et vice versa.

De même, mais pour les protéines du blé solubles dans l'eau, ABBOT (1964) retient le Sephadex G 100 (en milieu lactique 0,5 N) après avoir étudié de nombreux éluants et toutes les porosités.

FEILLET (1965) sépare les albumines des globulines sur Sephadex G 25 : compte tenu des caractères de solubilité respectifs de ces 2 groupes protéiques, il note en effet qu'en déposant un extrait salin de farine sur une colonne de Sephadex G 25 équilibrée par l'eau, et en éluant par NaCl 0,5 M, les albumines sortent les premières, les globulines devant nécessairement suivre le front salin. Cet auteur vérifie que les protéines ainsi isolées ont un comportement électrophorétique semblable aux albumines et aux globulines isolées selon la méthode d'OSBORNE.

DESCHREIDER (1964 *a*), fractionne les protéines solubles dans l'eau sur Sephadex G 75 et isole 6 pics ; les deux premiers, *a* et *b*, représentent respectivement 16,35 p. 100 et 13 p. 100 des protéines déposées et ont un poids moléculaire supérieur ou égal à 40 000 ; les fractions suivantes, *c*, *d*, *e*, et *f* (respectivement 14,6, 30,4, 17,3 et 8,35 p. 100 des protéines) ont un poids moléculaire compris entre 40 000 et 1 000.

TABLEAU 12

Caractéristiques des protéines solubles du blé fractionnées sur Sephadex G 100
(selon JANKIEWICZ et POMERANZ, 1965)

Fraction	Poids moléculaire	P. 100
1	?	5,7
2	> 150 000	11,8
3	83 000	16,9
4	53 000	11,3
5	32 000	34,5
6	18 000	8,8
7	env. 15 000	3,2
8	< 15 000	7,8

Un extrait pyrophosphate de blé est fractionné sur Sephadex G 100 (tampon acétate ; pH = 4,1) par JANKIEWICS et POMERANS (1965) en 8 constituants dont le poids moléculaire et l'importance relative sont donnés dans le tableau 12.

Tout dernièrement, MOUREAUX et *al.* (1966) séparent sur gel de Sephadex G 100 les albumines du grain de maïs en cinq fractions différenciées par leur comportement électrophorétique et leur composition en acides aminés (tampon acétate ; pH = 4,4; $\mu = 0{,}025$). Celles du blé sont fractionnées en 4 groupes de constituants par FEILLET et BOURDET (1966) dans des conditions voisines.

C — *Chromatographie sur d'autres supports.*

Nous mentionnerons ici, pour mémoire, les essais de fractionnement sur gel de phosphate de calcium réalisés par ZUEVA et *al.* (1961). L'emploi généralisé des échangeurs d'ions cellulosiques a fait abandonner ce type de support.

CONCLUSIONS

Ainsi qu'il se dégage des travaux analysés dans ce chapitre et résumés page suivante, les biochimistes sont loin d'avoir élaboré des techniques de fractionnement suffisamment fines et reproductibles pour réaliser l'isolement de protéines homogènes à partir des albumines-globulines des céréales. Le dénombrement lui-même des fractions constitutives ne semble pas terminé puisque des méthodes de séparation telles que l'électrophorèse en gel d'amidon et en gel de polyacrylamide, ou l'immunoélectrophorèse conduisent à l'identification d'un nombre tous les ans plus important de constituants protéiques. On peut d'ailleurs s'interroger sur la validité de ce décompte, et se demander si la même protéine n'est pas représentée sur les diagrammes d'électrophorèse en gel par plusieurs bandes distinctes, en raison de phénomènes de polymérisation ou d'interaction moléculaire d'une part, et de filtration différentielle à travers le support d'autre part. Il reste néanmoins raisonnable de penser qu'il existe une vingtaine de protéines solubles différenciées dans les céréales, sans qu'il soit possible de fixer une valeur précise et de dire avec certitude lesquelles sont de type albumines et lesquelles de type globulines, problème sur lequel nous reviendrons lors de la conclusion générale de cette revue.

Les tentatives de fractionnement par chromatographie ont conduit à des résultats relativement décevants, les pics isolés par échange d'ions ou par filtration moléculaire demeurant hétérogènes. Il est cependant possible que l'emploi d'échangeurs telles que la TEAE et la SM-cellulose, ou la CM et la DEAE-Sephadex jamais utilisés, à notre connaissance, pour l'étude des albumines et des globulines des céréales puissent conduire à des résultats plus satisfaisants. Il n'en demeure pas moins que l'électrophorèse préparative doit permettre des séparations plus sélectives, mais cette méthode semble devoir demander de longues mises au point pour l'utiliser avec les supports les plus efficaces que sont le gel de polyacrylamide ou d'amidon. Quant aux techniques reposant sur des différences de solubilité (relargage par exemple) elles conduisent plus à des purifications qu'à des fractionnements.

En conclusion, ce sera sans doute par la combinaison de ces différentes méthodes qu'il sera possible d'isoler un jour toutes les fractions protéiques solubles des céréales, mais on peut facilement imaginer la somme de travail que nécessitera encore l'aboutissement d'un si vaste programme.

Bilan récapitulatif des principaux fractionnements réalisés par Ultracentrifugation, Électrophorèse et Chromatographie

Nombre de fractions identifiées

		Ultracentrifugation	Électrophorèse					Chromatographie		
			En veine liquide	Sur papier	En gel d'amidon	En polyacrilamide	Immunoélectrophorèse	Sur CM-cellulose	Sur DEAE-cellulose	Sur gel de dextrane
Albumines	Blé Orge Maïs		6 (1) 7 (1)	11 (2) 7 (5) 5 (9)			11 (3)	10 (6)	16 (7)	4 (4) 6 (8) 5 (10)
Globulines	Blé Orge Maïs	3 (11) 7 (13) 2 (11)		2 à 3 (9)	3 (12)					10 (13)
Protéines solubles dans les sels	Blé Orge		9 (15)		20 (16)		17 à 22 (20)	6 (17)	8 (18)	8 (19)
Protéines solubles dans l'eau	Blé Maïs		6 (24)		15 à 17 (21)			7 (22) 8 (25)	11 (21)	6 (23)
Protéines basiques	Blé Orge Maïs			4 (26)	16 (27)	10 (28) 10 (28) 10 (28)				

(1) Waldschmidt-Leitz et Hochstrasser, 1961 ; (2) Pence, 1953 ; (3) Safonov et Safonova, 1965 ; (4) Feillet et Bourdet, 1966 ; (5) Waldschmidt-Leitz, 1959 ; (6) Préaux et *al.*, 1963 ; (7) Enari et Mikola, 1961 *a* ; (8) Enari et *al.*, 1963 *b* ; (9) Tsurkan, 1962 ; (10) Moureaux et *al.*, 1966 ; (11) Pence et Elder, 1953 ; (12) Elton et Ewart, 1962 ; (13) Nummi, 1963 *b* ; (14) Davidson, 1949 ; (15) Kelley et Koenig, 1962 ; (16) Feillet et Bourdet, 1964 ; (17) Oh et Gehrke, 1965 ; (18) Simmonds, 1963 ; (19) Jankewicz et Pomeranz, 1965 ; (20) Grabar et *al.*, 1962 et 1965 ; (21) Nimmo et *al.*, 1963 ; (22) Deschreider, 1964 *b* ; (23) Deschreider, 1964 *a* ; (24) Craine et Fahrenholtz, 1958 ; (25) McGuire et *al.*, 1960 ; (26) Enari et *al.*, 1962 *a* ; (27) Enari et *al.*, 1963 *a* ; (28) Mikola, 1965.

III. — PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DES PROTÉINES SOLUBLES

Les deux chapitres précédents nous ont permis de préciser quelles étaient les méthodes d'extraction, de purification et de fractionnement des protéines solubles et ont mis en évidence l'extrême hétérogénéité des préparations isolées. Nous nous proposons de terminer cette étude en indiquant les propriétés générales des fractions habituellement dénommées albumines et globulines.

Nous envisagerons successivement :

leurs propriétés physico-chimiques ;
leur métabolisme ;
leur importance quantitative.

3. 1. Propriétés physico-chimiques.

Les propriétés physico-chimiques des albumines et des globulines des céréales sont encore extrêmement mal connues. L'absence de techniques de fractionnement suffisamment sélectives a en effet considérablement retardé l'analyse de fractions protéiques purifiées ; ainsi que nous le verrons, quelques très rares travaux seulement ont porté sur des protéines relativement homogènes, et il ne s'agit encore que d'études difficiles à relier entre elles.

La majorité des renseignements que l'on peut trouver dans la littérature concerne donc pour leur plus grande part des groupes protéiques assez mal définis : fractions solubles dans l'eau ou dans les sels, pics chromatographiques, protéines isolées par relargage, etc. Nous exposerons dans ce paragraphe l'état actuel des travaux réalisés en ce domaine.

Nous traiterons :

— des propriétés physiques (masse moléculaire, point isoélectrique) ;

— des propriétés chimiques (composition en acides aminés, complexes protéiques purothionine) ;

— des propriétés enzymatiques (du point de vue des propriétés physico-chimiques des enzymes).

3. 1. 1. *Propriétés physiques.*

A — *Masse moléculaire.*

Les déterminations de masse moléculaire sont peu nombreuses et concernent surtout les protéines de l'orge. Les valeurs trouvées ont été rassemblées dans le tableau 13.

Ces résultats appellent les commentaires suivants :

— contrairement à ce qui est classiquement admis, il existe des albumines de masse moléculaire très élevée, pouvant atteindre 300 000 (Nummi et *al.*, 1966);

— le fait que la γ-globuline de Quensel (1942) ait une masse moléculaire inférieure à celle de Danielson (1949) doit être attribuée à la présence d'α-globuline dans la première ;

TABLEAU 13

Masse moléculaire des protéines des céréales (en millier)

Auteurs	Albumines			Globulines										Fractions purifiées	Protéines solubles totales
	Blé	Orge		Blé		Orge				Maïs		Seigle		Blé	Blé
	totales	totales	basique	α	γ	α	β	γ	δ	α	γ	α	γ		
Quensel (1942)						26	100	166	300						
Danielson (1948)		54													
Danielson (1949)				29	210	29		210		29	210	29	210		
Pence et Elder (1953)	28														
Chollot et Urion (1959)							113								
Kelley (1964)															
Deschreider (1964 *a*)														75	≥ 40 < 3
Jankiewics et Pomeranz (1965)															83 52 38 15 11 < 15
Mikola (1965)			45 33 20 12												
Nummi et *al.* (1966)		300 13													
Materon et *al.* (1965 *a*)		70													

— MAZERON et *al.* (1965 *a*) n'expliquent pas la discordance entre leur résultat (masse moléculaire de l'albumine de l'orge : 70 000 et celui de DANIELSON (1948) (masse moléculaire : 54 000), mais, pensent que certains paramètres (taux d'hydratation, teneur en azote) ne sont pas déterminés avec suffisamment d'exactitude ;

— selon PENCE et ELDER (1953), et contrairement à DANIELSON (1949) la δ-globuline identifiée dans l'orge existerait également dans le blé ;

— CHOLLOT et URION (1959) ont montré que la β-globuline de l'orge, de masse moléculaire peut différente de 100 000 à pH = 6-7, peut former des agrégats 5 fois plus gros à pH < 5 ;

— la présence d'urée dans une solution d'albumines du blé abaisse la masse moléculaire de celle-ci de 28 000 à 17 000 (PENCE et ELDER, 1953).

B — *Point isoélectrique.*

Les données sont encore moins nombreuses que celles relatives aux masses moléculaires.

— selon PENCE (1953), les albumines du blé se classent en trois groupes α, β et γ, de points isoélectriques compris entre 4,5 et 4,8, 4,9 et 5,9, 6,7 et 8,7 ;

— la protéine purifiée de KELLEY (1964) a un pH_i égal à 6,2 et se situe donc entre les β et γ albumines de PENCE (1953) ;

— QUENSEL (1942) donne respectivement 5, 4,9 et 5,7 comme point isoélectrique des α, β et γ globulines de l'orge et 5,8 pour l'albumine ;

— les protéines du maïs solubles dans l'eau ont un pH_i plus faible compris entre 3 et 5 (MCGUIRE et *al.*, 1960).

3. 1. 2. *Propriétés chimiques.*

A — *Composition en acides aminés.*

Nous avons regroupé dans le tableau 14 la composition en acides aminés des albumines et des globulines du blé, de l'orge et du maïs. Pour faciliter les comparaisons, tous les résultats ont été exprimés en grammes d'acides aminés pour 16 g N total. On n'a pas fait mention des études faites sur des extraits salins ou aqueux totaux pour lesquels les prolamines, souvent présentes, fausseraient l'interprétation des analyses.

— les albumines du blé, de l'orge et du maïs ont une composition voisine ; il en est de même des globulines ;

— comparativement aux protéines du gluten, les albumines et les globulines sont pauvres en acide glutamique et en proline, mais plus riches en acides aminés basiques ;

— PENCE et ELDER (1953) ont mis à profit la richesse en arginine des globulines comparativement aux albumines (14,7 au lieu de 8,7 g pour 16 g N selon ces auteurs) ainsi que leur pauvreté en tryptophane (0,9 au lieu de 3,1) pour doser ces deux protéines dans un mélange) ;

— la teneur élevée en cystine des protéines de l'orge a été notée par BISERTE et SCRIBAN (1950) ; JENSEN (1952) a précisé que les β-globulines étaient en majeure partie responsables de cette richesse ;

TAIL EAU 14

Composition en acides aminés des protéines solubles des céréa exprimée en g Acides aminés pour 16 g N total.

	Albumines										Globulines				Fractions purifiées									Gluten
	Blé				Orge		Maïs		Bl			Orge		Maïs	Blé									Blé
	Osborne (1907)	Bodo (1961)	Waldschmidt-Leitz et *al.* (1961)	Feillet (1965)	Folkes et Yemm (1956)	Waldschmidt-Leitz et *al.* (1961)	Boundy (1965)	Moureaux et *al.* (1966)	Bodo (1961)	Horn et *al.* (1965)	Feillet (1965)	Folkes et Yemm (1956)	Jensen (1952)	Moureaux et *al.* (1966)	Kelley (1964)	Coates et Simmonds (1961) (1)			Nimmo et *al.* (1963) (2)					Woychik et *al.* (1961 *b*)
																A	D + E	F	4	5	6	7	10 +11	
Glycocolle	0,9	4,2	2,6	4,3	5,7	5,1	6,1	6,7	5,6	—	5,1	9,1	4,2	5,3	4,5	3,1	5,8	6,0	4,0	5,0	5,5	5,3	5,7	3,1
Alanine	4,4	5,2	4,7	5,2	7,3	7,2	6,4	7,3	5,0	—	5,9	0,6	6,5	5,3	3,5	3,3	6,3	6,2	6,1	7,1	7,7	6,6	6,8	2,4
Valine	—	5,9	7,0	5,9	7,7	7,4	5,5	6,0	5,7	6,6	5,6	5,5	9,5	6,1	5,4	3,5	7,2	7,0	5,2	7,0	7,2	7,2	7,0	4,1
Leucine	11,3	8,1	9,2	7,3	8,5	7,9	5,8	5,8	6,7	6,3	7,7	6,7	11,0	6,3	8,9	6,0	9,5	10,7	5,7	7,4	7,8	8,6	8,9	6,8
Isoleucine		3,7	3,5	3,7	6,1	4,0	3,4	3,6	3,5	3,9	3,8	3,3	3,2	3,3	3,5	3,6	4,4	4,8	2,1	2,4	3,3	3,5	4,1	4,0
Sérine	—	5,1	4,0	4,7	4,9	4,5	3,4	5,1	4,9	—	4,9	4,7	4,3	5,9	4,9	4,1	5,4	4,6	4,1	4,4	4,9	4,8	4,3	5,2
Thréonine	—	3,7	2,4	3,8	4,7	3,5	3,8	5,1	3,2	3,5	4,2	3,3	5,9	3,2	5,1	3,7	4,1	4,6	2,9	2,7	3,3	3,9	3,3	2,5
Phénylalanine	3,8	4,3	4,3	3,8	5,7	4,5	3,5	3,4	4,9	—	3,8	4,0	4,7	5,4	2,9	5,5	3,4	4,0	1,9	2,1	2,6	3,2	5,5	4,9
Tyrosine	3,3	4,2	2,9	4,0	5,6	4,4	2,3	3,6	3,2	—	3,6	3,1	8,5	3,3	5,6	2,5	5,4	7,5	3,3	4,8	5,0	5,6	5,4	3,8
Proline	3,2	8,7	7,2	7,2	5,6	6,4	10,0	5,4	4,1	—	4,3	3,6	13,3	4,1	10,4	—	—	—	6,1	7,0	7,1	6,7	5,3	13,7
Tryptophane	—	1,7	—	—	1,5	—	—	—	0,8	—	—	0,8	3,8	—	—	—	—	—	2,5	3,4	3,3	2,8	2,9	1,0
Cystine + Cystéine	—	2,5	5,7	—	2,0	0,2	1,4	4,3	0,9	—	—	3,5	9,4	1,7	6,7	—	—	—	4,2	5,3	6,0	5,2	1,6	2,1
Méthionine	—	2,0	0	2,1	2,0	0,4	1,6	1,5	1,5	1,3	2,0	1,3	3,2	1,2	2,7	—	—	—	1,4	2,2	2,6	2,2	2,4	1,8
Acide aspartique	3,3	8,1	6,7	7,0	12,2	10,9	12,5	9,3	7,9	—	8,7	8,5	8,8	7,6	7,1	6,2	9,7	10,8	6,1	6,8	7,3	8,1	10,5	2,9
Acide glutamique	6,7	18,0	15,1	19,1	14,6	12,3	14,1	11,5	14,9	—	11,6	10,2	17,8	15,6	13,9	27,0	21,0	18,0	13,9	14,6	14,8	15,0	14,8	37,3
Histidine	2,8	2,0	3,6	2,5	2,6	5,2	2,9	2,6	3,1	1,8	2,2	1,9	1,7	3,5	2,0	2,3	3,7	3,8	1,8	2,8	2,1	2,8	3,6	2,2
Arginine	5,9	6,1	6,4	6,0	6,5	7,0	7,8	7,8	11,8	—	7,8	11,0	2,7	11,9	8,4	5,5	9,3	9,8	4,9	8,0	8,1	7,0	6,8	2,4
Lysine	2,7	4,0	9,4	4,2	6,7	7,7	5,9	6,2	4,2	4,1	7,6	5,3	8,1	5,2	2,5	3,7	5,4	5,6	3,9	4,4	5,3	5,6	5,4	1,2

(1) β-globuline.
(2) Résultats calculés en g acides aminés pour 16 g N total par Pence et *al.* (1964).

— selon WOYCHIK (1963), les acides N terminaux des protéines du blé solubles dans l'eau sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, la sérine, la thréonine et l'alanine ; ceux des pics D, E et F de SIMMONDS (1963) sont respectivement la sérine, la sérine, la sérine et la thréonine ; par ailleurs, WALDSCHMIDT-LEITS (1963) indique l'acide glutamique et la sérine pour les albumines et les globulines de l'orge et de l'avoine. D'après ce même auteur, l'acide glutamique serait l'acide C-terminal des albumines et globulines de l'orge, et l'acide aspartique celui des protéines solubles de l'avoine.

B — *Complexes protéiques.*

Des chercheurs ont démontré la nature complexe de certaines protéines solubles des céréales et ont pu mettre en évidence la présence parmis celle-ci de glycoprotéines, de nucléoprotéines et de lipoprotéines.

α) *Glycoprotéines* — L'existence de glycoprotéines dans les albumines a été supposée par de nombreux auteurs en raison de la pauvreté en azote de certaines préparations protéiques isolées (COATES et SIMMONDS, 1961 ; SIMMONDS, 1963 ; STROBEL et HOLME, 1964 *a* ; NEUKOM, 1964). On peut néanmoins se demander si les glucides sont mélangés aux protéines, fixés par adsorption ou encore liés chimiquement. WALDSCHMIDT-LEITS et HOCHSTRASSER (1961), ont montré que les α, β et γ albumines du blé et de l'orge contenaient une quantité importante de glucides, même après purification par électrophorèse préparative ; dans tous les cas, l'hydrolyse libérait du glucose, du xylose et de l'arabinose. Par contre, PENCE et ELDER (1953) ont isolé par relargage une albumine très riche en azote (17,1 p. 100 s. s.), ce qui semblait plaider en faveur de l'absence de liaison chimique entre glucides et protéines. L'existence d'une glycoprotéine a néanmoins été prouvée par HOCHSTRASSER (1961), cet auteur étant parvenu à isoler un alanylxylopyranose qui établirait la liaison entre les glucides et les albumines de l'orge. En 1963, HOCHSTRASSER (1963) montre que l'acide aspartique est un des constituants essentiels de ces liaisons glycopeptidiques. ROHRLICH et *al.* (1963) étudie la stabilité de ces liaisons : l'électrophorèse des extraits aqueux (du blé et du seigle) révèle une seule bande à pH = 4,6 colorable par l'amidoschwartz (colorant des protéines) et le phtalate d'aniline (colorant des sucres) ; à pH 4,6, les deux bandes sont dissociées, ce qui prouve l'instabilité de la glycoprotéine en milieu très acide. Selon KUNDIG et NEUKOM (1963), la principale fraction glycoprotéique du blé contient du galactose et de l'arabinose, mais pas de xylose ; les acides N-terminaux seraient la tyrosine et le tryptophane. Il y aurait, selon WRENCH (1965), un peu de xylose. FAUSCHE et *al.* (1963), enfin, détectent la présence d'acide férulique dans ces complexes.

β) *Nucléoprotéines.* — Nos connaissances sur les nucléoprotéines des céréales restent très limitées. LUSENA (1951), KAY et DOUNCE (1953) ont signalé l'existence de nucléoprotéines dans le germe des céréales, mais il faut attendre AYRAPAA (1957) pour que celles-ci soient caractérisées dans le reste de l'amande. Déjà, POOL et SHOOTER (1955 *b*) et AYRAPAA (1955) avaient montré que de petites quantités d'acides nucléiques étaient présents dans les protéines solubles. AYRAPAA (1957) montre que 5 p. 100 du matériel azoté précipité d'un extrait salin d'orge par l'acide trichloracétique est de l'ARN et de l'ADN (33 p. 100 des acides nucléiques totaux) ; ces acides nucléiques sont en totalité dans la fraction globuline. Les travaux de MAITSUSHTA

(1958) sur le blé conduisent à des conclusions voisines. FEILLET (1965) et BOURDET et FEILLET (1967) précisent ces résultats : les globulines du blé contiendraient 9,7 p. 100 d'acides nucléiques (3,7 p. 100 ADN et 6,0 ARN p. 100 s. s.). Mais on peut se demander si ces nucléoprotéines ne proviennent pas du germe, toujours difficile à éliminer.

γ) *Lipidoprotéines.* — Selon AYRAPAA (1957) 2,5 à 5 p. 100 des lipides de l'orge seraient liés aux globulines. FEILLET (1965) a signalé par ailleurs la présence de lipides (6,1 p. 100 m. s.) dans les globulines purifiées du blé.

C — *Purothionine.*

Il est intéressant de noter ici l'existence d'une protéine soluble du blé isolé à l'état cristallisé : la purothionine.

BALLS et *al.* (1942), poursuivant l'étude préliminaire de BALLS et HALE (1940) ont isolé une substance de nature protéique à partir d'un extrait « éther de pétrole » de farine. Par dissolution et précipitation successive par l'éthanol 70 p. 100 et 90 p. 100 ces auteurs obtiennent un produit cristallisé qu'ils appellent « purothionine » en raison de sa richesse en soufre [1]; ses propriétés sont les suivantes :

— soluble dans l'eau et l'éthanol aqueux ; insoluble dans les solvants des lipides ; précipité par le sulfate d'ammonium 2 M ;

— teneur en azote : 17,3 p. 100 ; teneur en soufre : 4,4 p. 100 ; pas de phosphore ;

— composition en acides aminés : arginine 2 p. 100 ; cystine 16 p. 100 ; tyrosine 3 p. 100 ; tryptophane : traces.

Cette substance a une activité bactéricide et bactériostatique (STUART et HARRIS, 1942) et possède un pouvoir inhibiteur sur la fermentation des blés broyés (BALLS et HARRIS, 1944). Ce serait une protamine existant dans la farine sous forme d'un complexe lipoprotéique ; sa teneur en cystine est cependant exceptionnelle.

D'autres protéines très riches en soufre ont été isolées des albumines d'avoine (WALDSCHMIDT-LEITZ et ZWISLER, 1963), des globulines de l'orge (JENSEN, 1952) et du riz (HOUSTON et *al.*, 1964), mais ne semblent pas former un groupe homogène. On peut par ailleurs rapprocher les propriétés de la purothionine de celles d'une hémoprotéine isolée du germe de blé par WASSERMAN et BURRIS (1965).

3. 1. 3. *Propriétés enzymatiques.*

La majorité des enzymes des céréales sont solubles en milieu aqueux ou salin et sont donc à classer parmi les protéines solubles. Faute de méthode convenable, très peu de chercheurs se sont préoccupés de préciser les propriétés moléculaires de ces enzymes de sorte que les travaux apportant des précisions sur la nature physicochimique de celles-ci sont encore très peu nombreux.

Ces dernières années, cependant, les amylases ont retenu plus spécialement l'attention de quelques chercheurs. Nous nous contenterons d'exposer ici les renseignements les plus récents que l'on possède sur celles-ci, sans chercher à faire une mise au point complète sur les enzymes, sur lesquels on trouvera une excellente documentation dans les revues de REED et THORN (1964) et de JOHNSON (1965) pour le blé, HARRIS (1962 *b*) pour l'orge, SCRIBAN (1965) et DAUSSANT (1966 *a*) pour les amylases de l'orge, BURGER (1966) pour les protéases de l'orge.

[1] Πυροτ : blé θειον : soufre.

En ce qui concerne l'orge, on a démontré qu'il existait des β-amylases libres et liées (SANDEGREN et KLANG, 1950) qui correspondraient selon POLLOCK et POOL (1958) à une même entité protéique. AYRAPAA et NIHLEN (1954) ont localisé les β-amylases libres dans la fraction albumine. Tout en confirmant ce résultat, DAUSSANT (1966 *b*) montre qu'il existe néanmoins des quantités minimes de β-amylase dans les globulines de l'orge (et non dans celles du malt). Ce même auteur (DAUSSANT et *al.*, 1965) précise que les β-amylases séparées sur Sephadex G 100 en fonction de leur taille moléculaire par NUMMI et *al.* (1965) ont la même structure antigénique et donc une structure protéique commune, et possédent la même mobilité électrophorétique en gel d'agar. FRYDENBERG et NIELSEN (1965) ont cependant mis en évidence l'existence de deux β-amylases de comportement électrophorétique différent. Selon NUMMI et *al.* (1965), les caractéristiques des β-amylases sont les suivantes (tabl. 15) :

TABLEAU 15

Caractéristiques physicochimiques des β-amylases de l'orge

Fraction	Coefficient de sédimentation	Coefficient de diffusion	Poids moléculaire
A_1	4,6	6,6	55 500
A_2	6,8	6,6	
-	—	6,6	
A_3	9,6	6,6	
-	7,9-9,6	4,2-5,3	
Liée	4,6	6,6	

Ajoutons enfin que la β-amylase reste immunochimiquement identique au cours du maltage, mais que sa mobilité électrophorétique diminue (DAUSSANT, 1966 *b*) : $3{,}2 \times 10^{-2}$ cm² volt^{-1} sec^{-1} pour la β-amylase de l'orge (pH = 8,2 ; véronal 0,05 M), $2{,}1 \times 10^{-2}$ cm² volt^{-1} sec^{-1} pour la β-amylase du malt (pH = 8,2 ; véronal 0,05 M).

TABLEAU 16

Caractéristiques physicochimiques des β-amylases du blé

	Fractions		
	A	B	E
Azote p. 100 s. s.	16,60	16,70	16,50
Constante de sédimentation S^o 20, W	4,58	4,58	4,58
Constante de diffusion ($\times 10^7$) cm² sec^{-1}	6,49	6,51	6,44
Volume spécifique partiel (ml/g)	0,733	0,733	0,733
Masse moléculaire (g)	64,200	64,200	64,200
Mobilité (10^{-5} cm² sec^{-1} volt^{-1}) pH = 4,0	2,67	2,26	1,50
— pH = 8,0	— 6,97	— 4,95	— 7,71
Point isoélectrique	4,9	4,4	4,1
pH optimum	5,4	4,6	5,2-6,2

La β-amylase du blé a été tout dernièrement étudiée par TIPPLES et TKACHUK (1965) et TKACHUK et TIPPLES (1966). Ces auteurs isolent trois β-amylases (A, B et E) en combinant un fractionnement par relargage au sulfate d'ammonium et une séparation sur DEAE-cellulose. Ces trois fractions ne se différencient que par leur comportement électrophorétique et leur pH d'activité optimum. Elles sont homogènes en ultracentrifugation et en électrophorèse de Tiselius ; leur composition en acides aminés est presque identique. Leurs caractéristiques sont données dans le tableau 16.

L'α-amylase est relativement moins bien connue. Elle serait selon AYRAPAA et NILHEN (1954) et DAUSSANT (1966 *b*) de type globuline. Son poids moléculaire serait d'environ 60 000. Inexistante dans l'orge, elle n'apparaît qu'au moment de la germination. Selon GRABAR et DAUSSANT (1963, 1964), l'apparition du pouvoir α-amylolytique correspondrait à une synthèse de l'enzyme tandis que GREENWOOD et MAC GREGOR (1965) pensent que la germination provoque l'activation d'un précurseur.

3. 2. MÉTABOLISME

3.2.1. *Évolution au cours de la maturation du grain.*

Ainsi qu'il ressort des tableaux 17, 18 et 19, la quantité de protéines solubles du grain en p. 100 N total diminue au cours de la maturation, que ce soit pour le blé (WOODMAN et ENGLEDOW 1924 ; GRAHAM et *al.*, 1963 ; JENNINGS et MORTON, 1963 *a* ; MEN'SHIKOVA et AKHUNBAEVA, 1964 ; FEILLET, 1965) , l'orge (BISHOP, 1930) ou le sorgho (TSURKAN, 1962). En ce qui concerne le maïs, les résultats de ZELENY (1935)

TABLEAU 17

Évolution de la composition en protéines solubles du grain de blé au cours de la maturation (FEILLET, 1965)

Protéines solubles	Nombre de jours après la fécondation					
	+ 8	+ 12	+ 20	+ 27	+ 35	+ 52
N p. 100 N protéique	26,2	30,7	26,6	20,7	15,9	14,0
mg N p. 100 grains secs	123	257	752	1 080	1 270	1 190

TABLEAU 18

Évolution de la composition en protéines solubles du grain d'orge au cours de la maturation (BISHOP 1930)

Protéines solubles	Nombre de jours après la fécondation					
	+ 25	+ 32	+ 35	+ 42	+ 49	+ 57
N p. 100 N protéique	54	29	25	11	11	12
mg N pour 100 grains	230	460	580	400	430	490

et de TSURKAN (1962) sont contradictoires : suivant le premier, les albumines et globulines du maïs sont synthétisées à vitesse relativement constante, leur importance dans le grain restant voisine de 1,5 p. 100 N_T pour les albumines et de 7,5 p. 100 N_T pour les globulines ; suivant le second, les protéines solubles du maïs se comportent comme celles des autres céréales.

TABLEAU 19

Évolution de la composition en albumines et globulines du grain de maïs au cours de la maturation (p. 100 N_T)
(ZELENY, 1935)

État du grain	Globulines	Albumines
Très jeune	7,71	1,47
Laiteux	6,58	2,23
Visqueux	8,42	1,30
Mûr	7,82	1,71

Qualitativement, ni la chromatographie sur DEAE-cellulose (GRAHAM et *al.*, 1963), ni l'électrophorèse en gel d'amidon (GRAHAM et MORTON, 1963), ne permettent à GRAHAM de conclure à des différences dans la composition des protéines solubles durant la maturation. D'après MIKOLA (1965), les protéines basiques de l'orge seraient cependant synthétisées tardivement, lorsque le grain a atteint sa teneur maximum en azote. FEILLET (1965), note également l'apparition des constituants de plus grande mobilité en milieu acide (protéines basiques) dans les albumines globulines du blé à partir du 35e jour après la fécondation. JENNINGS et MORTON (1963 *b*), enfin montrent que la composition en acides aminés des protéines solubles change pendant la maturation.

Plusieurs auteurs se sont demandés si les protéines solubles étaient des précurseurs des prolamines et des glutélines. Une étude à l'aide de traceurs radioactifs conduit BILINSKI et McCONNEL (1958) à conclure négativement dans le cas des albumines du blé ; le fait que le rapport protéines solubles/ARN soit sensiblement constant suggère à JENNINGS et MORTON (1963 *a*) que les albumines-globulines seraient au contraire pour la plupart des protéines intermédiaires ; l'utilisation de traceurs ne permet pas à GRAHAM et MORTON (1963) de confirmer cette hypothèse. COULSON et SIM (1965 *c*) se demandent si ces protéines ne seraient pas seulement les enzymes nécessaires à la synthèse des protéines du gluten mais ne peuvent conclure. En ce qui concerne le maïs, TSURKAN (1962) pense que les globulines se transformeraient en zéine et glutéline tandis que INGLE et *al.* (1965) considèrent les protéines solubles comme précurseurs de la zéine.

3. 2. 2. *Évolution au cours de la germination.*

La germination de l'orge a été la plus étudiée en raison de son importance en malterie. Dès 1929, BISHOP (1929) a montré que le taux d'albumines-globulines demeurait sensiblement constant durant la germination. Selon SAVERBORN et *al.* (1944), la β-globuline demeure intacte tandis que la γ-globuline, abondante dans le germe, est rapidement dégradée. BISERTE et SCRIBAN (1950) et SCRIBAN (1951)

indiquent qu'il n'y a pas de modification qualitative dans le comportement électrophorétique des « albumines-globulines » de l'orge ; tout juste peut-on noter une légère augmentation relative de la teneur en fraction A. D'après MIKOLA (1965), des changements qualitatifs interviendraient néanmoins ainsi que des transformations quantitatives importantes. Par immunochimie, GRABAR et DAUSSANT (1963) montrent que le malt ne contient plus que 12 fractions protéiques au lieu de 20 dans l'orge ; par ailleurs, l'α-amylase n'apparaîtrait dans le grain qu'après le début de la germination (GRABAR et DAUSSANT, 1964).

L'accroissement de la teneur en amylase est également signalé par ALEXANDRESCU (1962) chez le maïs, et celle en lipase, par DRAPRON et *al.* (1965) chez le blé.

Selon COULSON et SIM (1965 *c*), les fractions les plus mobiles d'un extrait acétique de farine de blé (albumines-globulines) ne sont pas encore altérées au 13e jour de la germination, mais il n'en subsiste plus que des traces après 17 jours.

VONES et *al.* (1964) trouvent une teneur en globulines supérieure dans les grains germés, ce qui montrerait que ces protéines sont moins attaquées par les protéases que les prolamines et les glutélines.

Il apparaît donc que les protéines solubles sont bien moins sensibles à la germination que celles du gluten. Cela se comprend aisément quand on sait leur nature cytoplasmique, alors que les prolamines et les glutélines sont des protéines de réserve.

3. 3. IMPORTANCE QUANTITATIVE

3. 3. 1. *Généralités.*

En raison de l'extrême diversité des résultats présentés dans la littérature, il n'est pas possible de donner des chiffres précis sur la teneur des céréales en protéines solubles. Comme BOURDET (1956) l'a clairement montré, cela tient essentiellement à la complexité du matériel étudié et à la multiplicité des méthodes d'extraction utilisées ; certains dosent les albumines (en tant que fraction soluble dans l'eau), puis les globulines (solubles dans les sels après extraction par l'eau) ; d'autres les

TABLEAU 20

Composition en protéines solubles des céréales selon OSBORNE (*g protéines p. 100 g grains s.s.*) (d'après BOURDET, 1956)

	Blé	Orge	Avoine	Seigle	Riz	Maïs
Albumines	0,4	0,3		0,43	1,6-3,2	
Globulines	0,6	1,95	1,5	1,70	0,5	0,4

extraits salins totaux ; d'autres enfin différencient les albumines des globulines par dialyse. De plus, il n'est que rarement tenu compte des prolamines et de l'azote non protéique solubilisés.

Les chiffres avancés par OSBORNE, aussi imparfaits qu'ils soient en raison des méthodes d'extraction retenues, donnent une première indication sur cette composition (tabl. 20).

TABLEAU 21

Composition en protéines solubles des céréales — Résultats exprimés en p. 100 d'azote total (les valeurs entre parenthèses représentent les minimum et les maximum)

Céréale	Produit	Azote soluble dans :		Albumines	Globulines	Alb. + Glob.	Auteurs
		Eau	Sels				
Blé	Farine	11,1					CUNNINGHAM et *al.* (1955)
	Farine			9,1 (6,8-11,5)	8,3 (5,8-10,8)	17,4 (13,6-21,4)	PENCE et *al.* (1954 *b*)
	Farine					15,25 (10,1-20,0)	FEILLET (1965)
	Farine					20,3 (14,8-30,2)	BABADSHANYAN (1963)
	Farine			10			HOLME (1962)
Orge	Grain		35,2 (30,1-38,8)				BISHOP (1930)
	Farine		17,1				BISERTE et SCRIBAN (1954)
	Farine		12,5				CUNNINGHAM et *al.* (1955)
Maïs	Grain		16 (14,7-18,7)				BOURDET (1966)
	Grain	11,7	12,4				DOTY et *al.* (1946)
	Grain	11	22				FOSTER (1950)
Avoine	Farine	13,1					CUNNINGHAM et *al.* (1955)
	Grain		29				CSONKA (1941)
Seigle	Farine	35,7					CUNNINGHAM et *al.* (1955)
	?			8	8		KENT-JONES et AMOS (1957)
Riz	?			3 à 17	0 à 10,5		LINDNER (1963)
	Riz Paddy			3,45 (2,7-4,6)	5,15 (3,7-6,4)		CAGAMPANG et *al.* (1966)
Sorgho	Grain					12,9 (9-16,2)	BOURDET (1966)

Les travaux les plus récents ne permettent malheureusement pas d'apporter toutes les corrections nécessaires à ces valeurs ; en ce qui concerne l'orge, l'avoint ou le maïs par exemple, les données que l'on peut actuellement trouver demeurene en effet très incomplètes (tabl. 21). Il en est différemment du blé où les chiffres les plus significatifs sont apparemment ceux de PENCE et *al.* (1954 *b*) :

— les protéines solubles représentent 17 p. 100 en moyenne (32 échantillons) des protéines totales (max. : 21,4 ; min. 13,6), ce qui correspond à 1 790 mg d'albumines-globulines dans 100 g de farine (m. s.) (max. : 2 290 ; min. : 1 320) ;

— il y a légèrement plus d'albumines (moyenne : 9,1 p. 100 des protéines totales) que de globulines (moyenne : 8,3 p. 100) ;

— 100 g de farine (m. s.) contiennent en moyenne 940 mg (max. : 1 410 et min. : 640) d'albumines et 840 mg (max. 1 240 et min. 680) de globulines.

Sur 20 échantillons, FEILLET (1965) trouve des teneurs en albumines-globulines plus faibles (moyenne : 15,25 p. 100 ; max. : 20,0 p. 100 ; min. : 10,1 p. 100 des protéines totales) ; il dose dans 100 g de farine (m. s.) 1 660 mg de protéines solubles en moyenne (max. : 2 060 ; min. : 1 370). Les chiffres donnés par BABADZHANYAN (1963) sont au contraire plus élevés : moyenne : 20,3 ; maximum : 30,2 ; minimum : 14,8 p. 100 des protéines totales. Comme PENCE et *al.* (1953 *b*), HOLME (1962) indique une teneur en albumines de l'ordre de 10 p. 100 des protéines totales.

On doit à CAGAMPANG et *al.* (1966) de posséder des renseignements très récents sur le riz ; il ressort de leurs travaux qu'il y a en moyenne 398 mg d'albumines et 541 mg de globulines dans 100 g de riz, soit près de deux fois moins que dans la farine de blé. L'importance relative des protéines solubles par rapport aux protéines totales est également plus faible : albumines : 3,45 p. 100 en moyenne ; globuline : 5,15 p. 100. Les chiffres donnés par LINDNER (1963) sont, par contre, beaucoup plus dispersés.

Sur 12 échantillons, BISHOP (1930) solubilise de 38,8 à 30,1 p. 100 de l'azote total de l'orge (grain) dans une solution saline (moy. : 35,2 p. 100) tandis que BISERTE et SCRIBAN (1950) en extraient 17,1 p. 100 à partir d'une farine. Plus récemment, DJURTOFT (1961) indique qu'il est possible d'isoler à partir de 100 g d'orge : 338 mg d'α-globulines, 86 mg de β-globulines, 47 mg de γ-globulines, 10 mg d'albumines et 130 mg du groupe $< \alpha$-globulines, soit 609 mg de protéines solubles ; ces chiffres nous donnent donc une indication sur les proportions respectives de ces fractions dans l'orge ; les globulines forment le constituant le plus abondant (plus de 50 p. 100 des protéines solubles totales) ; il faut noter par ailleurs la très faible quantité d'albumines. Selon WALDSCHMIDT-LEITZ (1961), les γ-globulines seraient au contraire plus abondantes que les β.

Il y aurait, selon BOURDET (1966) environ 16 p. 100 d'azote soluble dans le maïs (grain) (moyenne de 13 échantillons). DOTY et *al.* (1946) estiment à 10,8-12,6 p. 100 la teneur en albumines et à 12-12,8 p. 100 celle en globulines. Deux maïs analysés par MOSSÉ et *al.* (1966) contiennent en moyenne 6 p. 100 d'azote non protéique et 14 p. 100 d'albumines et de globulines.

Les albumines-globulines de l'avoine représentent, d'après CSONKA (1941) 29 p. 100 de l'azote total, la fraction soluble dans l'eau n'intervenant d'après CUNNINGHAM et *al.* (1955) que pour 13 p. 100.

KENT-JONES et AMOS (1957) indique une teneur en albumines et en globulines toutes deux égales à 8 p. 100 dans le seigle ; CUNNINGHAM et *al.* (1955) solubilisent dans l'eau

35,7 p. 100 de l'azote total de cette céréale. D'après HAGBERG (1950), il y a deux fois plus d'azote hydro-soluble dans le seigle que dans le blé.

Enfin, 12,9 p. 100 des protéines du sorgho seraient solubles dans NaCl 0,5 M (moy. : 12,9 ; max. : 16,2 ; min. : 9,0) (BOURDET, 1966).

3. 3. 2. *Facteurs de variation.*

Si les différences que nous pouvons relever dans les résultats ci-dessus s'expliquent en partie par les méthodes expérimentales utilisées, il est bien certain que la nature des échantillons étudiés est un facteur de variation non négligeable : origines génétiques, conditions de développement, traitements technologiques sont autant de caractéristiques pouvant modifier la teneur en protéines solubles des céréales.

A — *Facteurs génétiques et agronomiques.*

Il ressort des résultats de nombreux auteurs (CHABOT, 1940 ; PENCE, 1954 *b* ; BELL et SIMMONDS, 1963 ; FEILLET, 1965) que l'importance relative des protéines solubles est d'autant plus grande qu'il y a moins d'azote dans le grain. De ce fait, l'apport d'azote tardif se traduit par une diminution du taux d'albumines-globulines (GUNSEL, 1962 ; FEILLET, 1965).

Exprimée en mg de protéines par 100 g de farine, la teneur en protéines solubles du blé semble sensiblement constante et serait donc indépendante des conditions de culture ; c'est ce qui ressort en effet du tableau 22 (FEILLET, 1965).

Selon BISHOP (1930), une relation mathématique relie les teneurs en protéines solubles et en azote total de l'orge.

$$S = aN - bN^2$$

S : azote soluble.
N : azote total.
a et *b* : coefficients caractéristiques d'une variété.

D'après DJURTOFT (1961) l'importance relative des fractions solubles est plus sous la dépendance des facteurs agronomiques que des facteurs génétiques. [1]

B — *Facteurs histologiques et technologiques.*

On possède peu de renseignements sur la répartition histologique des protéines solubles dans le grain, mais il est généralement admis que les enveloppes sont plus riches que l'endosperme :

— BOURDET (1956) évalue à 15 p. 100 les protéines solubles de la farine, à 20 p. 100 celles du blé entier et à 31 p. 100 celles du son ;

[1] La composition électrophorétique des protéines solubles du blé semblerait par contre sous l'unique dépendance du patrimoine héréditaire et ne serait donc pas modifiée par les conditions de culture (PENCE et al., 1954 c ; COULSON et SIM, 1946 et 1965 b ; FEILLET, 1965), il est probable qu'il en est de même pour les autres céréales. Il existe de ce fait d'importantes différences entre les espèces (SIM, 1963 ; COULSON et SIM, 1964 ; ELTON et EWART, 1964 ; MIKOLA, 1965). En particulier, PENCE et al. (1954 c notent que les albumines des blés durs sont spécialement riches en fractions alpha et celles des blés tendres en fractions β_1 et β_2 ; FEILLET (1965) aboutit à une conclusion identique par électrophorèse en gel d'amidon. Par ailleurs, des différences dans les proportions respectives des fractions constitutives ont été mises en évidence entre les variétés d'une même espèce par KELLEY et KOENIG (1963) et KOENIG et al. (1964) dans le cas des blés tendres, et par WALDSCHMIDT-LEITZ et HOCHSTRASSER (1961) et MIKOLA (1965) dans le cas des orges.

— CAGAMPANG et al. (1966) soulignent la richesse du son de riz en albumines (4,2 p. 100 m. s.) et en globulines (4,1 p. 100 m. s.).

TABLEAU 22

Composition en protéines solubles des farines Cappelle *et* Heurtebise (FEILLET, 1965)

Cappelle			*Heurtebise*		
Protéines p. 100 s. s.	Alb.-Glob. p. 100 s. s.	Alb.-Glob. p. 100 prot.	Protéines p. 100 s. s.	Alb.-Glob. p. 100 s. s.	Alb.-Glob. p. 100 prot.
8,5	1,37	16,1	10,2	1,65	16,2
9,1	1,60	17,6	10,7	1,65	15,4
9,7	1,59	16,4	11,1	1,71	15,4
10,4	1,59	15,3	11,4	1,65	14,5
11,3	1,54	13,6	12,0	1,65	13,7
12,6	1,54	11,8	14,2	1,43	10,1

— selon SAVERBORN et *al.* (1944), on trouverait essentiellement des γ-globulines dans l'endosperme tandis que les α et β seraient concentrées dans l'aleurone (orge) ;

— la répartition en α, β et γ globulines chez le blé serait la suivante (PENCE et *al.*, 1954 *a*) :

Globulines	α	β	γ
Farine	44	46	7
Germe	14	67	15

— MIKOLA (1965) précise que les protéines basiques de l'orge sont localisées dans l'endosperme ;

— les protéines adhérentes de HESS (1954) seraient relativement plus riches en protéines solubles que les protéines interstitielles (ELTON et EWART, 1964 ; COULSON et SIM, 1965 *a*) ;

— de ce fait, la turboséparation provoque un remaniement de la composition protéique (WRIGLEY, 1963 ; FEILLET, 1965 ; BAUDET et *al.*, 1966). Comme il ressort du tableau 23 suivant, la classification des farines par l'air a pour effet d'appauvrir la fraction fine en protéines solubles (exprimées en p. 100 des protéines totales).

TABLEAU 23

Composition en protéines solubles (p. 100 protéines totales) des fractions fines, moyennes et grosses isolées de trois farines I, II et III (d'après WRIGLEY, 1963)

Fractions	I	II	III
Fines	17	19	17
Moyennes	28	28	27
Grosses	25	26	23

— FEILLET (1965) note enfin que les farines basses sont les plus riches en protéines solubles, ce qui s'explique aisément par leur origine histologique (tabl. 24).

TABLEAU 24

Composition en protéines solubles de différents passages de la mouture
(FEILLET, 1965)

	Broyage		Convertissage		Farine basse
	Tête	Queue	Tête	Queue	
g dans 100 g farine s. s.	2,08	2,39	1,77	2,96	3,88
P. 100 protéines totales .	19,2	18,9	15,9	21,5	25,8

CONCLUSIONS GENERALES

Au terme de cette mise au point, au cours de laquelle nous avons tenté de faire ressortir les méthodes d'étude et quelques propriétés des protéines solubles des céréales, un des faits essentiel qui se dégage est l'absence d'une terminologie suffisamment rigoureuse qui permette l'interprétation des résultats, tous les ans plus nombreux, relatifs aux albumines et aux globulines. Nous essayerons donc, en conclusion, de dégager dans quel sens, selon nous, pourrait être recherché un essai de classification.

Classiquement, les albumines des céréales sont définies comme la fraction protéique des grains soluble dans l'eau et les solutions salines, tandis que les globulines représentent la fraction uniquement soluble en milieu salin. Nombreux sont les faits expérimentaux qui démontrent l'insuffisance de cette conception : d'une part la solubilité dans l'eau et les sels n'est pas une caractéristique spécifique des albumines puisque les gliadines, à un moindre degré, le sont aussi ; d'autre part le fait que des protéines de type « globuline » demeurent solubles après dialyse limite la signification de cette classification. Si les définitions d'OSBORNE sont donc à rejeter en tant que critère absolu de différenciation entre les groupes protéiques des céréales, elles ne restent cependant pas moins à la base de nombreux travaux expérimentaux ; l'étude des protéines des céréales est en effet grandement facilitée par un fractionnement préliminaire reposant sur ces caractéristiques de solubilité. C'est ce qui ressort en particulier de nos travaux (BOURDET et FEILLET, 1963 ; FEILLET, 1965) au cours desquels nous avons pu montrer qu'il était possible, dans des conditions expérimentales bien contrôlées et en ne faisant intervenir que des phénomènes de solubilité différentielle dans l'eau et les solutions salines, d'isoler des albumines totalement dépourvues de gliadines et de globulines (telles qu'on les définit habituellement).

Des critères plus rigoureux doivent donc être recherchés pour définir et caractériser les albumines et les globulines.

Faisant suite aux travaux de PENCE (1954), qui différenciait les albumines des globulines du blé par la relative richesse en tryptophane et la pauvreté en azote amidé des premières, et par la richesse en arginine et la pauvreté en tryptophane et en azote amidé des secondes, WALDSCHMIDT-LEITZ (1963) a proposé une classification reposant sur la composition en acides aminés et la nature glycoprotéique des protéines des céréales. S'il est ainsi possible de différencier les albumines des globulines et des autres groupes protéiques, nous ne pensons cependant pas que ces critères puissent être à la base, pour l'instant du moins, d'une classification générale permettant de caractériser la vingtaine de protéines solubles existante dans chaque céréale, les connaissances actuelles sur la composition en acides aminés de ces fractions protéiques étant pratiquement nulles.

Un système de classification basé sur la valeur des constantes de sédimentation des protéines, comme cela a été fait avec les globulines de l'orge, n'apparaît pas généralisable. On ne doit pas non plus espérer pouvoir utiliser un système reposant sur le comportement chromatographique des fractions.

La caractérisation des protéines par leur mobilité électrophorétique semble bien plus satisfaisante. Suivant ce critère, et dans le cas du blé, ELTON et EWART (1962) distinguent les globulines (très mobiles) des albumines (de mobilité moyenne) et des gliadines (plus lentes) (pH = 3,2) (les gluténines ne migrent pas). GEHRKE et *al.* (1964) ont proposé une nomenclature différente ; selon ces auteurs, on peut distinguer par ordre de mobilité croissante (pH = 3,2) :

— une zone diffuse (S zone) contenant les gliadines et quelques gluténines ;
— les albumines lentes (A_s) ;
— les globulines lentes (G_s) ;
— les protéines de base, communes à tous les groupes (B) ;
— les albumines rapides (A_f) ;
— les globulines rapides (G_f).

L'existence des protéines de base ne ressort pas de nos travaux (FEILLET, 1965) qui semblent cependant confirmer la présence de globulines lentes et de globulines rapides. De ce fait, la mobilité électrophorétique des protéines à pH = 3,2, insuffisante pour différencier les albumines des globulines, serait un excellent critère d'identification des gliadines et des albumines-globulines.

D'autres travaux devront montrer si cette conclusion est généralisable ou non aux autres céréales.

En ce qui concerne une classification des protéines solubles entre elles, et non plus une différenciation avec les autres groupes, la caractérisation devrait se faire aux pH basiques auxquels la séparation est la plus fine. L'immunoélectrophorèse permettant de caractériser les constituants d'un mélange protéique par leur mobilité et par leur spécificité antigénique, la commission des protéines de l'*European Brewery Convention* a recommandé l'utilisation de l'analyse immunoélectrophorétique comme méthode de référence pour la définition des protéines des extraits d'orge. On peut souhaiter que cette proposition soit élargie aux autres céréales, mais on doit souligner qu'un travail considérable reste à faire pour mener à bien cette entreprise. Il est d'ailleurs possible que l'utilisation des méthodes immunochimiques dans des

supports plus efficaces que la gélose, tels que les gels d'amidon ou de polyacrylamide, conduise à des caractérisations mieux définies et plus complètes.

Un dernier point sur lequel on n'a peut-être pas toujours assez insisté est la différence fondamentale qui existe entre les albumines et globulines sériques, et les albumines et globulines des céréales. Ces protéines se différencient les unes des autres autant par leur solubilité que par leur composition en acides aminés, leur masse moléculaire, leur comportement électrophorétique, leurs propriétés biologiques, ... et n'ont finalement en commun que leur nom. Regrettant que des protéines si différentes soient regroupées sous le même vocable, nous suggérons donc que des mots nouveaux soient créés pour dénommer les albumines et les globulines des céréales, comme cela a d'ailleurs été nécessaire avec les prolamines et les glutélines qui sont apparues dès leur découverte comme tout à fait caractéristiques du monde végétal.

Reçu pour publication en mai 1967.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABBOT D. C., 1964. Water soluble proteins of wheat flours. *Diss. Abstr.*, **25**, 1527.

ABBOT D. C., JOHNSON J. A., 1966. Gel filtration of the water-soluble protein fraction of wheat flour *J. Food Sci.*, **31**, 38-47.

ALEXANDRESCU V., 1962. Site de l'activité des amylases et des invertases dans les protéines solubles du maïs durant la germination (en roumain). *Studii Cercetări Biochim.*, **5**, 399-407.

ALEXANDRESCU V., 1964. Comportement électrophorétique des protéines solubles du germe de différentes variétés de maïs (en roumain). *Studii Cercetări Biochim.*, **7**, 347-350.

ARONSSON T., GRONWALL A., 1957. Improved separation of serum proteins in paper electrophoresis. A new electrophoresis buffer. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, **9**, 338.

AYRAPAA T., 1955. Two protein fractions of barley precipitated from acid solutions. *Acta chem. scand.*, **9**, 1403.

AYRAPAA T., 1957. On the presence of nucleoproteins and lipidoproteins in the salt-soluble protein fraction of barley. *Acta chem. scand.*, **11**, 1565-1575.

AYRAPAA T., NIHLEN H., 1954. Investigations on barley malt amylases and related proteins. *Acta chem. scand.*, **8**, 88-105.

BABADZHANYAN K. A., 1963. Composition des protéines du blé (en russe). *Izv. Akad. Nauk. Arm. S. S. S. R.*, **16**, 79-81.

BALLS A. K., HALE W. S., 1940. A sulphur-bearing constituent of the petroleum ether extract of wheat flour (preliminary report). *Cereal Chem.*, **17**, 243-245.

BALLS A. K., HALE W. S., HARRIS T. H., 1942. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem.*, **19**, 279-288.

BALLS A. K., HARRIS T. H., 1944. The inhibitory effect of a prolamine from wheat flour on the fermentation of wheat mashes. *Cereal Chem.*, **21**, 74-79.

BARRÉ R., 1951. Préparation et purification des protéines des amandes. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **33**, 1473-1482.

BAUDET J., MOSSÉ J., 1962. Étude de l'extraction des protéines des graines. I. Extraction par l'eau des protéines de la farine de blé. *Ann. Physiol. vég.*, **4**, 315-331.

BAUDET J., MOSSÉ J., MOUREAUX Th., 1965. Sur les causes du fractionnement des protéines de la farine de blé solubles dans l'eau lors de leur extraction : interaction avec les composés phosphorés. *C. R. Acad. Sci.*, **260**, 1 007-1 009.

BAUDET J., BOURDET A., FEILLET P., GODON B., MOSSÉ J., PETIT L., 1966. Caractérisation des fractions protéiques des produits turboséparés. *Industr. aliment agric.*, **83**, 537-551.

BECCARI 1745. De Frumento. *De Bononiensi Scientarum et Artium Instituto atque Academia Commentarii.* II. Part. 1, 122.

BELL P. M., 1963. A critical study of methods for the determination of non protein nitrogen. *Anal. Biochem.*, **5**, 443-451.

BELL P. M., SIMMONDS D. H., 1963. The protein composition of different flours and its relationship to nitrogen content and baking performance. *Cereal Chem.*, **40**, 121-128.

BILINSKI E., McCONNEL W. P., 1958. Studies on wheat plants using carbon-14 compounds. VI. Some observations on protein biosynthesis. *Cereal Chem.*, **35**, 66-81.

BISERTE G., SCRIBAN R., 1950. Les Protides de l'orge. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **32**, 959-968.

BISERTE G., SCRIBAN R., 1953. Étude des protéines et des polypeptides de l'orge. *Proc. europ. Brew. Conv.*, 48-66.

BISHOP L. R., 1929. *J. Inst. Brewing*, **35**, 316.

BISHOP L. R., 1930. The proteins of barley during development and storage and in the mature grain. *J. Inst. Brew.*, **36**, 336-349.

BODO G., 1961. Über die Veranderungen der Weizenkornproteine durch Stickstoff Düngung. *Getreide u. Mehl*, **11**, 75-80.

BOUNDY J., 1965. Communication personnelle.

BOURDET A., 1956. Les protides des céréales. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 181-318.

BOURDET A., 1966. Influence des conditions de production, de récolte et de stockage sur la composition biochimique des céréales ; répercussions des variations sur la valeur nutritionnelle. III. Protides : Azote total et protéines. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **20**, 177-198.

BOURDET A., FEILLET P., METTAVANT F., 1963. Sur le comportement électrophorétique des prolamines du blé en gel d'amidon. *C. R. Acad. Sci.*, **256**, 4517-4520.

BOURDET A., FEILLET P., 1967. Distribution of phosphorus compounds in the constitutive protein fractions of various types of wheat flours. *Cereal Chem.*, 44, 102-127.

BURGER W. C., 1966. The proteases of barley and malt ; recent research. *Cereal Sci. Today*, **11**, 19-23, 31-32.

CAGAMPANG G. B., CRUZ L. J., ESPIRITU S. G., SANTIAGO R. G., JULIANO B. O., 1966. Studies on the extraction and composition of rice proteins. *Cereal Chem.*, **43**, 145-155.

CHABOT G., 1940. Nouvelles recherches sur la composition et les propriétés du gluten. *Bull. Éc. Meun. Belge*, **7**, 18-32.

CHAPON L., CHOLLOT B., URION E., 1961. Étude physicochimique des associations entre protéines végétales et substances polyphénoliques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **43**, 429-442.

CHOLLOT B., URION E., 1959. Structure of a beta-globulin sol as a function of pH and ionic strength. *Proc. europ. Brew. Conv.*, **7**, 45-60.

CLAYTON J. W., 1966. The extraction and ion-exchange chromatography of buffer-soluble and gluten proteins of wheat flour. *Cereal Chem.*, **43**, 495-516.

COATES J. H., SIMMONDS D. H., 1961. Proteins of wheat and flour. Extraction, fractionation and chromatography of the buffer soluble proteins of flour. *Cereal Chem.*, **38**, 256-272.

COHN E. J., 1925. *Physiol. Rev.*, **5**, 359.

COHN E. J., GURD F. R. N., SURGENOR D. M., BARNES B. A., BROWN R. K., DEROUAUX G., GILLEPSIE J. M., KAHNT F. W., LEVER W. F., LIU C. H., MITTELMAN D., MOUTON R. F., SCHMID K., VROMA E., 1950. A system for the separation of the components of human blood : quantitative procedure for the separation of the protein components of human plasma. *J. amer. chem. Soc.*, **72**, 465-474.

COULSON C. B., SIM A. K., 1961. Starch gel electrophoresis of isolated wheat gluten. *Biochem. J.*, **80**, 46-47.

COULSON C. B., SIM A. K., 1964. Proteins of various species of wheat and closely related genera and their relationship to genetical characteristics. *Nature*, **202**, 1305-1308.

COULSON C. B., SIM A. K., 1965 *a*. Proteins of wheat flour. *Nature*, **208**, 583-584.

COULSON C. B., SIM A. K., 1965 *b*. Wheat proteins. I. Fractionation and varietal variation of endosperm protein of *T. vulgare*. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 458-464.

COULSON C. B., SIM A. K., 1965 *c*. Wheat proteins. II. Changes in the protein composition of *Triticum vulgare* during the life cycle of the plant. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 499-508.

COURTOIS J., BARRÉ R., 1949. Influence de la réaction du milieu sur la précipitation de quelques esters phosphoriques avec une protéine de l'amande. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **31**, 740-749.

CRAINE E. M., FAHRENHOLTZ K. E., 1958. The proteins in water extracts of corn. *Cereal Chem.*, **35**, 245-259.

CSONKA F. A., 1941. Amino acids in oats and oats milling products including rolled oats. *Cereal Chem.*, **18**, 523-529.

CUNNINGHAM D. K., GEDDES W. F., ANDERSON J. A., 1955. Preparation and chemical characteristics of the cohesive proteins of wheat, barley, rye and oats. *Cereal Chem.*, **32**, 91-106.

DANIELSSON C. E., 1948. Molecular weight of malt-amylase. *Nature*, **162**, 525.

DANIELSSON C. E., 1949. Seed globulins of the Graminae and Leguminosae. *Biochem. J.*, **44**, 387-400.

DANIELSSON C. E., SANDEGREN E., 1947. Investigation of barley and malt amylase. *Acta chem. scand.*, **1**, 917-928.

DAUSSANT J., GRABAR P., NUMMI M., 1965. β-amylase. II. Identification des différentes β-amylases de l'orge et du malt. *Proc. europ. Brew. Conv.*, 62-69.

DAUSSANT J., 1966 *a*. Nouveaux résultats de recherches sur les amylases de l'orge. *Brasserie*, **3**, 2-7.

DAUSSANT J., 1966 *b*. Étude des protéines solubles de l'orge et du malt par des méthodes immunochimiques. *Brasserie*, **4**, 11-19 ; **5**, 2-15 ; **6**, 10-23.

DESCHREIDER A. R., 1964 *a*. Contribution à l'étude des protéines de froment solubles dans l'eau et dans l'alcool propylique. *Industr. aliment. agric.*, **81**, 21-27.

DESCHREIDER A. R., 1964 *b*. Action de divers cations métalliques sur les protéines du froment. *Industr. aliment. agric.*, **81**, 1083-1091.

DESCHREIDER A. R., 1965. Considération sur l'extraction continue des protéines de la farine de blé. *Industr. aliment. agric.*, **82**, 1265-1269.

DESREUX V., GHUYSEN J. M., 1951. VI. La polydispersité de l'acide ribonucléique de levure. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **60**, 410-423.

DIMLER R. J., 1965. Exploring the structure of proteins in wheat gluten. *Baker's Dig.*, **39**, 35-42.

DJURTOFT R., 1961. Salt-soluble proteins of barley (*Hordeum distichum*). Kobenhavn Dansk Videnskabs Forlag.

DJURTOFT R., 1963. Modern technique of protein investigation and their use in brewing. *Wallerstein Labo. Commun.*, **26**, 83-99.

DRAPRON R., N'GUYEN XUAN ANH, GUILBOT A., 1965. Study on the development of wheat lipase activity in the course of germination. *50th Ann. Meet. AACC.*

DOTY D. M., BERGDOLL M. S., NASH H. A., BRUNSON A. M., 1946. Amino acids in corn grain from several single cross hybrids. *Cereal Chem.*, **23**, 199-209.

ELTON G. A. H., EWART J. A. D., 1962. Starch gel electrophoresis of cereal proteins. *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 62-72.

ELTON G. A. H., EWART J. A. D., 1964. Electrophoretic comparison of cereal proteins. *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 119-126.

ENARI T. M., 1965. Composition of albumins and globulins barley. *Cereal Sci. Today*, **10**, 594-597.

ENARI T. M., 1966. Recent studies on barley and malt proteins. *Brew. Digest*, **41**, 84-88, 90-91.

ENARI T. M., MIKOLA J., 1961 *a*. Fractionation of barley albumins by chromatography on DEAE-cellulose. *Proc. europ. Brew. Conv.*, 62-68.

ENARI T. M., MIKOLA J., 1961 *b*. Comparison of the albumins of different cereal species. *Acta chem. scand.*, **15**, 1206-1207.

ENARI T. M., NUMMI M., MIKOLA J., 1961. *5th internation. Cong. Biochem.*, Moscou.

ENARI T. M., MIKOLA J., NUMMI M., 1962 *a*. Starch gel electrophoresis of basis water-soluble barley grain proteins. *Acta chem. scand.*, **16**, 517-518.

ENARI T. M., NUMMI M., MIKOLA J., MAKINEN V., 1962 *b*. Extraction of albumins and globulins of barley grain. *Finska kemists. Medd.*, **71**, 44-52.

ENARI T. M., MIKOLA K., NUMMI M., 1963 *a*. Präparierung und Stärkgelelektrophorese von basichen, wasserlöslichen Proteinen der Gerste und anderer Getreidaerten. *Brauwissenschaft*, **16**, 189-193.

ENARI T. M., PUPUTTI E., MIKOLA J., 1963 *b*. Fractionation of the proteolytic enzymes of barley and malt. *Proc. europ. Brew. Conv.*, **9**, 37-44.

FAUSCHE H., KUNDING N., NEUKOM H., 1963. Ferulic acid as a component of a glycoprotein from wheat flour. *Nature*, **199**, 4890.

FEILLET P., 1965. Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques. *Ann. Technol. agric.*, **14**, hors-série 1, 1-94.

FEILLET P., 1966. Les protéines du blé. *Bull. Éc. fr. Meun.*, **212**, 65-71.

FEILLET P., 1966. Les protéines solubles du blé ont-elles une importance technologique? *Techn. Meun.*, **111**, 8-11.

FEILLET P., BOURDET A., 1964. Sur le comportement électrophorétique en gel d'amidon des protéines du blé solubles en milieu salin neutre. *C. R. Acad. Sci.*, **258**, 2929-2932.

FEILLET P., BOURDET A., 1966. Comportement chromatographique des albumines de la farine de blé sur gel de Sephadex. *C. R. Acad. Sci.*, **263**, 2030-2032.

FLODIN P., PORATH J., 1954. Zone electrophoresis in starch columns. *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 175-182.

FOLKES B. F., YEMM E. W., 1956. The amino acid content of the proteins of barley grains. *Biochem. J.*, **62**, 4-11.

FOSTER J. R., YANG J. T., YUI N. H., 1950. Extraction and electrophoretic analysis of the proteins of corn. *Cereal Chem.*, **27**, 477-487.

FRYDENBERG O., NIELSEN G., 1965. *Hereditas*, **54**, 123.

GEHRKE C. W., OH Y. H., FREEARK C. W., 1964. Chemical fractionation and starch gel urea electrophoretic characterization of albumins, globulins, gliadins and glutenins in soft wheat. *Anal. Biochem.*, **7**, 439-460.

GIJSEL A. V., PREAUX G., LONTIE R., 1961. Fractionation of barley albumins by chromatography on carboxymethyl cellulose columns. *Arch. internation. Physiol. Biochim.*, **69**, 605-606.

GORTNER R. A., HOFFMAN W. F., SINCLAIR W. B., 1929. The peptization of wheat flour proteins by inorganic salts solutions. *Cereal Chem.*, **6**, 1-17.

GRABAR P., 1960. Étude de « Troubles au froid » par des méthodes immunochimiques. *Brasserie*, **164**, 121-128.

GRABAR P., BENHAMOU N., DAUSSANT J., 1962. Études électrophorétiques et immunochimiques de quelques protéines de l'orge et du blé. *Arch. Biochem. Biophys., supp. P1*, 187-189.

GRABAR P., DAUSSANT J., 1963. Recherches immunochimiques sur les protéines de l'orge et du malt. *Proc. europ. Brew. Conv.*, **9**, 45-57.

GRABAR P., DAUSSANT J., 1964. Study of barley and malt amylases by immunochemical methods. *Cereal Chem.*, **41**, 523-532.

GRABAR P., ESCRIBANO M. J., BENHAMOU N., DAUSSANT J., 1965. Immunochemical study of wheat, barley and malt proteins. *J. agric. Food Chem.*, **13**, 392-398.

GRAHAM J. S. D., 1963. Starch gel electrophoresis of wheat flour proteins. *Austral. J. biol. Sci.*, **16**, 342-349.

GRAHAM J. S. D., MORTON R. K., 1963. Studies of proteins of developing wheat endosperm : separation by starch-gel electrophoresis and incorporation of (^{35}S) sulphate. *Austral. J. biol. Sci.*, **16**, 357-365.

GRAHAM J. S. D., MORTON R. K., SIMMONDS D. H., 1963. Studies of proteins of developing wheat endosperm : fractionation by ion exchange chromatography. *Austral. J. biol. Sci.*, **16**, 350-356.

GRASSMANN W., 1951. Neu Verfahren der Elektrophorese auf dem Eiweissgebiet. *Naturwissenschaften*, **38**, 200-206.

GREENWOOD C. T., MAC GREGOR A. W., 1965. Isolation of α-amylase from barley and malted barley, and a study of the properties and action pattern of the enzymes. *J. Inst. Brewing*, **71**, 405-417.

GUNZEL G., 1962. Proteinfraktionen des Weizen-Mehles in Abhängigkeit von Herkunft, Sorte und Später N-Düngung. *Z. Acker-u. Pflanzenbau*, **114**, 325-340.

HAGBERG S., 1950. Water-soluble Nitrogen compounds in wheat and rye, and the influence of sodium chloride, potassium bromate, acidity, yeast, etc. *Bull. Éc. Meun. Belge*, **12**, 79-88.

HARRIS G., 1962 *a*. The structural chemistry of barley and malt. VI. Nitrogenous constituents. In COOK A. H., *Barley and Malt Biology, Biochemistry and Technology*, 497-552, Academic Press, N. Y. and London.

HARRIS G., 1962 *b*. The enzyme content and enzymic transformation of malt. In COOK A. H., *Barley and Malt Biology, Biochemistry and Technology*, 583-694, Academic Press, N. Y. and London.

HESS K., 1954. Protein, Kleber und Lipoid in Weizenkorn und Mehl. *Kolloid Z.*, **136**, 84-89.

HILL R. J., DJURTOFT R., 1964. Some immunoelectrophoretic studies on barley proteins. *J. Inst. Brewing*, **70**, 416-424.

HOCHSTRASSER K., 1961. Mitteilung über Samen proteine. VIII. Über die Bindungsart von Kohlenhydrat an Protein in Gerstenalbumin. *Z. Physiol. Chem.*, **324**, 250-253.

HOCHSTRASSER K., 1963. Über die Bindungsart von Kohlenhydrat an Protein in Gerstenalbumin. III. Nachweiss von Asparagylglucosidbindungen. *Z. Physiol. Chem.*, **333**, 99-104.

HOLME J., 1962. Characterization studies on the soluble proteins and pentosans of cake flour. *Cereal Chem.*, **39**, 132-144.

HORN M. J., JONES D. B., BLUM A. E., 1946. Colorimetric determination of methionine in proteins and foods. *J. Biol. Chem.*, **166**, 313-326.

HOUSTON D. F., MOHAMMAD A., HERNANDEZ N. E. A., 1964. High sulfur seed proteins. *Cereal Chem.*, **41**, 427-428.

INGLE J., BEITZ D., HAGEMAN R. H., 1965. Change in composition during development and maturation of maize seeds. *Plant. Physiol.*, **40**, 835-839.

JANKIEWICZ M., POMERANZ Y., 1965. Isolation and characterization of wheat flour proteins. I. Separation of salt and acetic acid-dispersible proteins by gel filtration ,polyacrylamide gel electrophoresis, and sucrose gradient ultracentrifugation. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 644-652.

JENNINGS A. C., MORTON R. K., 1963 *a*. Changes in carbohydrate, protein and non-protein nitrogenous compounds of developing wheat grain. *Austral. J. biol. Sci.*, **16**, 318-331.

JENNINGS A. C., MORTON R. K., 1963 *b*. Aminoacids and protein synthesis in developing wheat endosperm. *Austral J. biol. Sci.*, **16**, 384-394.

JENSEN R., 1952. On isolation and aminoacid composition of « β-globulin » extracted from the seed of barley (*Hordeum vulgare*). *Acta chem. scand.*, **6**, 771-781.

JENSEN R., 1953. Preliminary results of comparative ultracentrifugal experiments made on protein fractions isolated from barley samples received from the EBC trials in 1950 and 1951. *Proc. europ. Brew. Conv.*, 74-84.

JOHNSON J. A., 1965. Enzyme in wheat technology. *Cereal Sci. Today*, **10**, 315-318.

JONES R. W., TAYLOR N. W., SENTI F. R., 1959. Electrophoresis and fractionation of wheat gluten. *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 363-376.

KAMINSKI E., 1962. Study of wheat proteins in water, salt-solution, 70 p. 100 ethanol and dilute acetic acid by starch gel electrophoresis. *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 603-606.

KATAOKA J., 1963. Studies of barley proteins. Part. 1. The electrophoretic patterns, the salting-out curves and the column-chromatographic examination of albumin and globulin. *Rept. Res. Lab. Kirin Brewery C°, Ltd*, **6**, 51-67.

KAY E. R. M., DOUNCE A. L., 1953. The preparation of sodium ribonucleae wtith the use of sodium dodecylsulfate. *J. amer. Chem. Soc.*, **75**, 4041-4044.

KELLEY J. J., 1964. Purification and properties of a salt-soluble protein from wheat flour. *Arch. Biochem. Biophys.*, **106**, 167-172.

KELLEY J. J., KOENIG V. L., 1962. Electrophoretic analysis of flour proteins. I. « Salt-soluble » proteins. *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 644-650.

KELLEY J. J., KOENIG V. L., 1963. Electrophoretic analysis of flour proteins from various varieties of wheat. *J. Sci. Food Agric.* **14**, 29-38.

KENT N., MACHEBŒUF M., 1949. Recherches sur les protéines de la graine d'orge. *Proc. europ. Brew. Convent.*, 1-6.

KENT-JONES D. W., AMOS A. J., 1957. In *Modern Cereal Chemistry*, p. 105, The Northern Public, N. Y.

KOENIG V. L., OGRINS A., TRIMBO H. B., MILLER V. L., 1964. The electrophoretic analysis of flour from several varieties of hard red winter wheat grown at several locations. *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 492-497.

KUCERA M., FRANEK F., 1963. Utilisation de l'électrophorèse en bloc d'amidon pour l'étude des protéines du seigle (en tchèque). *Veda Vyzkum Prumysh Potravimaskem*, **12**, 61-72.

KUNDIG W., NEUKOM N., 1963. Untersuchugen über Getreideschleimostoffe. VI. Abbau eines glycoproteines mit proteolytischen Enzymen. *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1423-1426.

LANDRY J., SALLANTIN M., BAUDET J., MOSSÉ J., 1965. Extraction des protéines des graines. VI. Extraction exhaustive et fractionnement des protéines de la farine de blé. Électrophorèse en gel d'amidon des fractions séparées. *Ann. Physiol. vég.*, **7**, 283-293.

LASZTITY R., NEDELKOVITS J., 1964. Progrès récents sur les protéines du blé (en hongrois). *Magy. kem. Lapja*, **19**, 360-365.

LAWS W. D., FRANCE W. G., 1948. A comparative study of some protein fractions of wheat flour. *Cereal Chem.*, **25**, 231-243.

LINDNER K., 1963. Die biologische bedentung der pflanzlichen eiweissfraktionen. *Qualitas Plant Mat. Veget.*, **10**, 221-235.

LONTIE R., VOETS Th., 1959. Contribution à l'étude des prolamines et de l'azote résiduel de l'orge. Proc. *europ. Brew. Conv.*, 25-36.

LUNDIN H., 1963. The proteins of barley and malt. *Wallerst. Lab. Commun.*, **26**, 75-82.

LUSENA C. V., 1951. Preparation of ribonucleoprotein and ribonucleic acid from wheat germ. *Cereal Chem.*, **28**, 400-408.

MAES E., 1962. Progressive extraction of proteins. *Nature*, **193**, 880.

MATSUSHITA S., 1958. Studies on the nucleic acids in plants. I. Nucleic acid contents of cereal and pulse seed acid and nucleic acid containing fractions. *Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto University*, **14**, 14-23.

MATTERN P. J., VOLKMER G. H., SALEM A. E., 1966. Use of the Maes Continuous extraction process in the fractionation and study of wheat proteins. *Cereal Sci. Today*, **4**, 162.

MAZERON P., KRISCHER J., HORN P., METCHE M., URION E., 1965 *a*. Extraction et caractérisation de protéines d'orge. *C. R. Acad. Sci.*, **261**, 440-442.

MAZERON P., KRISCHER J., HORN P., METCHE M., URION E., 1965 *b*. Étude des protéines de l'orge. *C. R. Acad. Sci.*, **261**, 2359-2361.

MAZERON P., KRISCHER J., HORN P., 1966. Fractionnement des protéines hydrosolubles de l'orge. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **48**, 239-246.

MCGUIRE T. A., CRAINE E. M., DIMLER R. J., 1960. Chromatographic method for fractionating globulin of corn. *Cereal Chem.*, **37**, 329-333.

MECHAM D. K., MOHAMMAD A., 1955. Extraction of lipids from wheat products. *Cereal Chem.*, **32**, 405-415.

MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN W., 1959. Insoluble protein tannin compounds. *Acta Biochim. Polon.*, **6**, 375-383.

MEN'SHIKOVA N. N., AKHUNBAEVA B. O., 1964. Variation de la teneur en azote et en protéines de différentes espèces de blé d'hiver de Kirghizie au cours de la maturation du grain (en russe). *Akad. Nauk. Kirg. S. S. S. R.*, **96**, 106.

MERTZ E. T., LLOYD N. E., BRESSANI R., 1958. Studies on corn proteins. II. Electrophoretic analysis of germ and endosperm extracts. *Cereal Chem.*, **35**, 146-155.

MIKOLA J., 1965. Disc electrophoretic studies on the basic proteins of barley grain. *Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A, II*, **130**, 1-45.

MIKOLA J., NUMMI M., ENARI T. M., 1962. Effects of standing on the protein extracts of barley grain. *Nature*, **195**, 808.

MORTON R. K., 1950. Separation and purification of enzymes associated with insoluble particles. *Nature*, **166**, 1092-1095.

MORTON R. K., 1955. Methods for the extraction of enzymes from animal tissues. In COLOWICK S. P., KAPLAN N. O. *Methods in enzymology*, vol. **1**, 25-51. Academic Press, New York.

MOSSÉ J., 1967. Les protéines des céréales, in *Actualités Scientifiques*, Éditions Hermann (sous presse).

MOSSÉ J., BAUDET J., 1963. Sur les conditions d'extraction aqueuse des protéines de la farine soluble dans l'eau. *C. R. Acad. Sci.*, **257**, 537-540.

MOSSÉ J., BAUDET J., GUYON P., 1964. Mise au point d'un procédé d'extraction continue des protéines d'une farine de graine. Application à la farine de blé. *C. R. Acad. Sci.*, **258**, 368-371.

MOSSÉ J., BAUDET J., LANDRY J., MOUREAUX Th., 1966. Étude comparée sur les proportions et les compositions en acides aminés des fractions protéiques des grains de Maïs normaux et mutants. *C. R. Acad. Sci.*, **263**, 788-791.

MOUREAUX Th., 1965. Extraction des protéines des graines. V. Les composés phosphorés de la farine de blé, facteurs du fractionnement protéique au cours de l'épuisement de la farine par l'eau. *Ann. Physiol. vég.*, **7**, 5-24.

MOUREAUX Th., BAUDET J., MOSSÉ J., 1966. Fractionnement des albumines du Maïs par chromatographie sur Sephadex. *C. R. Acad. Sci.*, **262**, 1710-1713.

NARAYAN K. A., VOGEL M., LAWRENCE J. D., 1965. Disk electrophoresis of wheat flour proteins with a modified apparatus utilizing gels of rectangular cross section. *Anal. Biochem.*, **12**, 526-540.

NIMMO C. C., O'SULLIVAN M. T., MOHAMMAD A., PENCE J. W., 1963. Fractionation and zone electrophoresis of proteins of water soluble materials of flour. *Cereal Chem.*, **40**, 390-398.

NEUKOM H., 1964. Neuere Untersuchungen über die wasserlöslichen Pentosane des Weizenmehls. *Getreide u. Mehl*, **14**, 13-16.

NUMMI M., 1963 *a*. Fractionation of barley globulins on dextran gel columns. *Acta chem. scand.*, **17**, 527-562.

NUMMI M., 1963 *b*. Exlusion chromatography, ultracentrifugation and salting out of barley globulins. *Suomen kemistilehti B.*, **36**, 112-114.

NUMMI M., ENARI T. M., 1962. Die Fraktionierung von Gerstenalbuminen durch Gel Filtration und Papier elektrophorese. *Brauwissenschaft*, **7**, 203-207.

NUMMI M., VILHUNEN R., ENARI T. M., 1965. β-amylase. I. β-amylase of different molecular size in barley and malt. *Proc. europ. Brew. Conv.*, **52**, 61.

NUMMI M., SEPPALA P., ENARI T. M., 1966. Molecular weight of the albumin fraction of barley. *Acta chem. scand.*, **19**, 2429-2431.

OH Y. H., GEHRKE C. W., 1965. Stepwise elution chromatographic isolation on CM-cellulose of A_s, G_s, Base and A_f proteins from wheat albumins and globulins. *Anal. Biochem.*, **10**, 409-414.

ORNSTEIN L., DAVIS B. J., 1962. *In Disc Electrophoresis* reprinted by distillation products industries, Rochester, New York.

OSBORNE T. B., 1907. *The proteins of the wheat kernel.* Carnegie Institution of Washington, Pub. n° 84.

PACE J., 1961. Recent work on the proteins of wheat flour. In *Recent Adv. Proc. Cereals Symp.*, 99-111, London.

PADMOYO M., HOGL O., 1962. Beiträge zu der Papierelektrophorese des Getreide-Eiweisses. *Mitt. Lebensm. Hyg.* Berne, **53**, 290-319.

PENCE J. W., 1953. Approximate isoelectric pH's of albumins from wheat flour. *Cereal Chem.*, **30**, 328-333.

PENCE J. W., ELDER A. H., MECHAM D. K., 1950. Preparation of wheat flour pentosanes for use in reconstituted doughs. *Cereal Chem.*, **27**, 60-66.

PENCE J. W., ELDER A. H., 1953. The albumins and globulins proteins of wheat. *Cereal Chem.*, **30**, 275-287.

PENCE J. W., WEINSTEIN N. E., MECHAM D. K., 1954 *a*. A method for the quantitative determination of albumins and globulins in wheat flour. *Cereal Chem.*, **31**, 29-37.

PENCE J. W., WEINSTEIN N. E., MECHAM D. K., 1954 *b*. The albumin and globulin contents of wheat flour and their relationship to protein quality. *Cereal Chem.*, **31**, 303-311.

PENCE J. W., WEINSTEIN N. E., MECHAM D. K., 1954 *c*. Differences in the distribution of components in albumin preparation from durum and common wheat flours. *Cereal Chem.*, **31**, 396-406.

PENCE J. W., MECHAM D. K., 1962. Recent advances in studies on wheat proteins. *Wall. Labor. Commun.*, **25**, 37-42.

PENCE J. W., NIMMO C. C., 1964. New knowledge of wheat proetins. *Bakers Dig.*, **38**, 38-40.

PENCE J. W., NIMMO C. C., HEPBURN F. N., 1964. In HLYNKA I., *Wheat Chemistry and Technology*, 227-268, A. A. C. C., Saint-Paul, Minnesota.

POLLOCK J. R. A., POOL A. A., 1958. *J. Inst. Brew.*, **64**, 151.

POOL A. A., SHOOTER E. M., 1955 *a*. The salt-soluble proteins of barley. I. A review. *J. Sci. Food Agric.*, **6**, 514-524.

POOL A. A., SHOOTER E. M., 1955 *b*. The salt-soluble proteins of barley. II. The detailed composition of saline extracts of barley-fractionation by precipitation with ammonium sulphate. *J. Sci. Food Agric.*, **6**, 524-534.

POOL A. A., SHOOTER E. M., 1955 *c*. The salt-soluble proteins of barley. III. The detailed composition of saline extracts of barley-fractionation by precipitation with ethanol. *J. Sci. Food Agric.*, **6**, 534-543.

PORATH J., FLODIN P., 1959. Gel filtration : a method for desalting and group separation. *Nature*, **183**, 1657-1659.

PRÉAUX G., VAN GIJSEL A., ROBIN C., WOUTERS A., LONTIE R., 1963. Fractionnement des albumines de l'orge. *Proc. europ. Brew. Conv.*, 59-77.

QUENSEL O., 1942. *Untersuchung über die Gerstenglobuline.* Dissertation. University of Uppsala, Sweden.

REED G., THORN J. A., 1964. In HLYNKA I., *Wheat Chemistry and technology*, 227-268, A. A. C. C., Saint-Paul, Minnesota.

ROHRLICH M., ESSNER W., LICHTENFELS I., 1963. Versuche zur chemischen Differenzierung der Eiwesstoffe des Weizens und Roggens. *Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch.*, 118-123.

RONDELET J., LONTIE R., 1953. Le fractionnement continu des albumines et globulines de l'orge. *Proc. europ. Brew. Conv.*, 22-32.

RONDELET J., LONTIE R., 1955. Nouvelles méthodes d'extraction et de fractionnement des protéines de l'orge. *Proc. europ. Brew. Conv.*, 90-97.

SAFONOV V. I., SAFONOVA M. P., 1965. Albumines de l'endosperme et de l'embryon de blé (en russe). *Dokl. Akad. Nauk. S. S. S. R.*, **165**, 704-707.

SANDEGREN E., 1948. Sur l'importance des protéines au brassage. *Brasserie*, **20**, 6-12.

SANDEGREN E., KLANG N., 1950. *J. Inst. Brew.*, **51**, 313.

SAVERBORN S., DANIELSSON K. E., SVEDBERG T., 1944. On the globulins of the cereals and malt. *Svensk. Kem. Tidskr.*, **56**, 75-85.

SCHWERDTFEGER E., 1958. *Beitr. Agrikulturchem. Probl. Forsh. Praxis*, **37**, 153.

SCRIBAN M. R., 1950. Sur la nature du « trouble fin » au réfrigérant. *Brasserie*, **43**, 9-11.

SCRIBAN R., 1951. *Les protides de l'orge, du malt et du moût.* Thèse, Lille.

SCRIBAN R., 1965. Les amylases de l'orge et du malt. *Bull. Éc. fr. Meun.*, **206**, 89-100.

SILAEV A. B., SHANG-HSIEN LIEH, SAFONOV V. I., 1965. Recherches sur les protéines du riz vietnamien par électrophorèse en gel de polyacrylamide (en russe). *Prikl. Biokhim. i. Mikrobiol.*, **1**, 150-152.

SIM A. K., 1963. *Studies on proteins of Graminae.* Thesis. Edimburgh University.

SIMMONDS D. H., 1963. Proteins of wheat and flour. The separation and purification of the pyrophosphate soluble proteins of wheat on DEAE-cellulose. *Cereal Chem.*, **40**, 110-120.

SIMOVA J., VESELY Z., 1963. Comportement électrophorétique des protéines du seigle (en tchèque). *Vyzbum Prumyslu Potravinarskem*, **12**, 41-59.

SOBER H. A., PETERSON E. A., 1954. Chromatography of proteins on cellulose ion-exchangers. *J. amer. Chem. Soc.*, **76**, 1711-1712.

STAHMANN M. A., 1963. Plant proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **14**, 137-158.

STONE C. D., HAMDY M. L., 1964. Protein complex of dough. *Bakers Dig.*, **38**, 36-53.

STROBEL R. G., HOLME J., 1964 *a*. Curtain electrophoretic separation of the water soluble constituents of bleached cake flour. *Cereal Chem.*, **41**, 351-360.

STROBEL R. G., HOLME J., 1964 *b*. Chemical composition of the water soluble constituents of bleached cake flour. *Cereal Chem.*, **41**, 361-371.

STUART L. S., HARRIS T. H., 1942. Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline proteins isolated from unbleached wheat flour. *Cereal Chem.*, **19**, 288-300.

SULLIVAN B., 1965. Wheat protein research. Fifty years of progress. *Cereal Sci. Today*, **10**, 338-344.

SULLIVAN B., DAHLE L. K., SCHIPKE J. H., 1963. The oxidation of wheat flour. IV. Labile and Nonlabile suflhydryl groups. *Cereal Chem.*, **40**, 515-531.

TIPPLES K. H., TKACHUK R., 1965. Wheat Beta-amylases. I. Isolation. *Cereal Chem.*, **42**, 111-124.

TKACHUK R., TIPPLES K. H., 1966. Wheat beta-amylases. II. Characterization. *Cereal Chem.*, **43**, 62-79.

TSURKAN P. A., 1962. Étude des protéines solubles du maïs et du sorgho par électrophorèse sur papier (en russe). *Izv. Akad. Nauk. Moldavsk*, **6**, 12-21.

URION E., LEJEUNE G., GOLOWTCHENKO V., 1944. La discrimination des constituants azotés de l'orge. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **26**, 303-310.

VONES F., PODRAZKY V., SIMOVA J., VESELY Z., 1964. Changements dans la composition protéique de l'endosperme de seigle durant la germination du grain et le chauffage de la farine (en tchèque). *Biokhim. Zerna i Klebopecheniya*, **7**, 151-158.

WALDSCHMIDT-LEITZ E., 1959. Über die verander lichkeit der zusammensetzung von eiweisstoffen der gerste. *Proc. europ. Brew. Conv.*, 37-44.

WALDSCHMIDT-LEITZ E., 1963. Zur chemischen systematik der getreideeiweisskörper. *Proc. europ. Brew. Conv.*, 78-84.

WALDSCHMIDT-LEITZ E., HOCHSTRASSER K., 1961. Über die Albumine aus Gerste und Weizen (VII. Mitteilung über samenprotein). *Z. Physiol. Chem.*, **324**, 243-249.

WALDSCHMIDT-LEITZ E., ZWISLER O., 1963. Über die Proteine des Hafers (XI. Mitteilung über Samenproteine). *Z. Physiol. Chem.*,**332**, 216-224.

WALL J. S., 1964. Cereal Proteins. In *Proteins and their reactions* (SCHULTZ H. W., ANGEMIER A. F.). Avi Publishing Company.

WASSERMAN A. R., BURRIS R. H., 1965. Hemoprotein from wheat germ. *Phytochemistry*, **4**, 413-423.

WOODMAN H. E., ENGLEDOW M. A., 1924. A chemical study of the development of the wheat grain. *J. agric. Sci.*, **14**, 563-586.

WOYCHIK J. H., 1963. Structural investigations of wheat gliadin and glutenin. *Proc. Seed Prot. Conf.*, 27-42.

WOYCHIK J. H., BOUNDY J. A., DIMLER R. J., 1961 *a*. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 477-482.

WOYCHIK J. H., BOUNDY J. A., DIMLER R. J., 1961 *b*. Aminoacid composition of proteins in wheat gluten. *J. agric. Food Chem.*, **9**, 307-310.

WRENCH P. M., 1965. The role of wheat flour pentosans in baking. III. Enzymic degradation of pentosan fractions. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 51-57.

WRIGLEY C. W., 1963. The protein composition of air-classified flour fractions. *J. Sci. Food Agric.*, **14**, 120-124.

ZAHN R. K., 1952. *Proc. internation. Congr. Biochem.*, **2**, 492.

ZELENY L., 1935. The distribution of nitrogen in the seed of Zea Mays at different stages of maturity. *Cereal Chem.*, **12**, 536-542.

ZUEVA E. S., MARKOSYAN L. S., PROSKURYAKOV N., 1961. Chromatographie des protéines sur gel de phosphate de calcium (en russe). *Biokhymia*, **26**, 209-211.

Le Directeur de la Publication : M.-L CAGNAG

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 9-1967

Dépôt légal : 3e trimestre 1967. *N° d'impression :* 964

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 16 1967 NUMÉRO 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique, à l'exception des sommaires et résumés.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (3), 195-203.

UTILISATION DES ULTRA-SONS POUR RÉCUPÉRER LES GERMES CONTENUS DANS UN FILM DE LAIT ADHÉRANT AUX SURFACES MÉTALLIQUES

G. DAUFIN, M. SAINCLIVIER

avec la collaboration technique de Noris BARBIER, L. KERHERVÉ, Anne-Marie ROBLOT

Laboratoire de Recherches de Technologie laitière,
Centre de Recherches agronomiques de l'Ouest, 35 - Rennes
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Nous avons utilisé les ultra-sons de fréquence 80 kHz pour enlever les germes adhérents à des plaques métalliques souillées et séchées.

Les germes contenus dans un film de lait séché sur une surface métallique ne sont pas détruits par les ultra-sons à cette fréquence. Une durée d'action des ultra-sons de 1,5 minute est suffisante pour les éliminer de la surface. Le même résultat est obtenu par un frottis à l'aide d'un coton stérile sur la surface préalablement immergée pendant 15 minutes. Mais la méthode aux ultra-sons, tout en étant aussi efficace, est plus simple et plus rapide.

INTRODUCTION

Le nettoyage du matériel laitier est une des opérations essentielles pour l'obtention d'un lait de bonne qualité bactériologique. Son efficacité est fonction de nombreux facteurs, dont les plus importants sont :

— la nature de la souillure à éliminer, elle-même fonction de l'état physico-chimique du lait et des traitements technologiques qu'il a subis,

— l'état de la surface à nettoyer, défini par le degré de polissage, l'intensité et la force de la corrosion, etc.,

— les conditions d'utilisation des détergents : composition, température et technique d'utilisation (immersion, émersion, pulvérisation).

Il est donc important, dans l'élaboration d'une méthode d'estimation de la souillure retenue par des surfaces métalliques — avant ou après nettoyage — de tenir compte de ces divers facteurs. Les nombreuses méthodes décrites dans la bibliographie comprennent plusieurs opérations : souillure, séchage, récupération du film de lait séché, évaluation physique, chimique ou bactériologique de l'importance de ce film. Chacune de ces opérations s'effectue dans des conditions fort différentes selon les auteurs (GARVIE et CLARKE, 1955 ; NEAVE et HOY, 1947 ; KAUFMANN, 1959 ; LISBOA, 1959 ; ANGELOTTI et *al*, 1958 ; MASUROVSKY et JORDAN, 1958-1960 ; SAINCLIVIER et *al.*, 1964).

Les méthodes qui semblent appelées au plus grand avenir sont celles qui utilisent les radioisotopes (JORDAN, 1966 ; MASUROVSKY et JORDAN, (1958) ont employé cette technique, mais JENNINGS (1961) précise qu'il est préférable de « marquer les bactéries » plutôt qu'un des constituants du lait (protéines, par exemple). Dans ce cas on observe une relation directement proportionnelle entre la quantité de souillure adhérente aux surfaces et la radioactivité mesurée. L'intérêt de cette méthode réside dans la possibilité qu'elle offre d'une mesure rapide, directement sur les surfaces, sans récupération préalable. Cependant cette méthode nécessite un appareillage spécialisé et demande, bien entendu, que l'on prenne les précautions relatives à l'utilisation des éléments marqués. Ces considérations en limitent, au moins provisoirement, l'emploi.

Les méthodes classiques nécessitent au contraire une récupération préalable de la souillure. Cette récupération peut s'effectuer par frottis (« Swab method » de l'American Public Health Ass., 1935 adaptée sous le nom de « Swab test » par divers auteurs notamment BARNES (1952)., AYNSLEY et BUOL (1957)), par rinçage (Can test : COUSINS et *al.*, (1960), Tube test : LISBOA., (1959)). Il s'avère que ces méthodes de récupération conduisent à des résultats souvent erronés car l'élimination de la souillure n'est pas complète.

Les ultra-sons de fréquence 80 kHz sont utilisés dans les laboratoires de métallurgie et de corrosion comme moyen le plus efficace pour le nettoyage chimique des surfaces destinées à des études métallographiques. MASUROVSKY et JORDAN (1960) ont utilisé des ultra-sons de fréquence 40 kHz comme agents mécaniques de nettoyage sur des surfaces de métal ou de verre, souillées avec des suspensions (dans le lait) de *Staphylococcus aureus*, marqué au P^{32}. Leur conclusion est que l'efficacité des ultrasons dépend de la concentration en germes, de l'état des surfaces et de la durée d'action des ultra-sons. Par ailleurs, il semblerait que les ultra-sons n'aient une action létale importante sur les germes que dans des conditions extrêmement sévères (hautes fréquences de l'ordre de 1 000 kHz, longue durée d'action, de dix minutes à plusieurs heures) (BIQUARD, (1948) ; DOGNON, (1953) ; HARVEY et LOOMIS, (1928) ; ELLIOT et WINDER (1955). Récemment HUHTANEN (1966) a effectué des dénombrements sur lait cru et sur lait pasteurisé traités aux ultrasons. Il a montré que les ultra-sons de fréquence 75 kHz agissant pendant des durées de 4,5 à 13,5 minutes permettent une désagrégation maximum des amas bactériens dans le lait cru. Dans le lait pasteurisé, les dénombrements ne sont pas plus élevés que sur le même lait non soumis à l'action des ultra-sons.

Nous nous sommes proposé de perfectionner la méthode bactériologique d'estimation des souillures par l'amélioration de la technique de récupération des germes adhérents aux surfaces en utilisant les ultra-sons (fréquence 80 kHz).

MATÉRIEL UTILISÉ ET TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Matériel utilisé

Le matériel destiné à être souillé par du lait est constitué par des plaques en acier inoxydable 18-10 bas carbone (AISI 304) de dimensions 100 × 50 × 2 mm. L'une des faces est polie mécaniquement au papier abrasif de grain n° 180 sur 25 cm² (5 × 5). Ce polissage est celui réalisé lors de la finition du matériel laitier.

Les plaques métalliques ainsi préparées présentent un état bien défini sur les 25 cm² de surface expérimentée. Deux trous, percés dans la partie non polie permettent de les suspendre verticalement, à l'aide de baguettes de verre, dans des béchers contenant 135 ml de liquide de Ringer au quart stérile, liquide dans lequel s'effectuera la mise en suspension des germes éliminés de la surface souillée.

L'appareil destiné à la production de l'énergie ultrasonique se compose de deux parties : le générateur METASON (STRUERS) et la cuve (capacité 1 600 cm³). A la base de cette dernière se trouve un oscillateur au titanate de baryum qui transforme l'énergie électrique fournie par le générateur en ondes ultrasoniques de fréquence 80 kHz dont l'intensité acoustique moyenne est de 0,4 W/cm². L'eau servant de fluide de transmission des ondes ultrasoniques est versée dans la cuve sur une hauteur de 3 cm.

Souillure

Les plaques polies sont souillées avec du lait de grand mélange, pasteurisé et écrémé. Ce lait est incubé pendant 18 heures à 22°C ± 0,1°C de façon que le nombre de germes par millilitre soit de l'ordre de 10^8.

Un dixième de millilitre du lait est étalé avec un fil de platine sur les 25 cm² de surface polie de chacune des plaques.

Séchage

Les plaques ainsi souillées sont immédiatement séchées à plat à l'étuve à 37°C pendant une heure dans une atmosphère dont l'humidité relative est de 20 p. 100.

Recherche de la durée d'action des ultra-sons permettant l'élimination totale des germes de la surface souillée et séchée

Après séchage, quinze plaques sont suspendues dans des béchers forme haute, sans bec, contenant 135 ml de liquide de Ringer au quart stérile (135 ml est le volume nécessaire pour que les 25 cm² de surface souillée soient immergés). Les plaques subissent ensuite trois types de traitements.

— *Série A.* Cinq d'entre elles sont soumises à l'action des ultra-sons de fréquence 80 kHz pendant 1,5 minute.

— *Série B.* Cinq autres plaques sont soumises à l'action des ultra-sons pendant 3 minutes.

— *Série C.* Les cinq dernières plaques sont soumises à l'action des ultra-sons pendant 5 minutes.

A l'issue de chaque traitement, les plaques sont retirées des liquides, égouttées soigneusement pendant trente secondes, recouvertes de gélose nutritive, puis déposées en boîtes de Petri stériles et incubées à 30°C pendant trois jours. On peut ainsi dénombrer les germes restant sur les plaques après 1,5 minute, 3 minutes, 5 minutes d'action des ultra-sons.

Les dénombrements des germes contenus dans les liquides de récupération s'effectuent selon la technique classique en boîtes de Petri sur gélose nutritive (PCA difco n° 0479).

Toutefois, malgré l'égouttage, il reste un film liquide sur la plaque. Si l'on veut dénombrer les germes qui n'ont pas été enlevés de la plaque par les ultra-sons, il convient de soustraire le nombre de germes contenus dans le film liquide du nombre total de germes comptés sur la plaque. C'est pourquoi, au cours de chaque essai, des plaques stériles sont plongées dans les liquides puis retirées, égouttées 30 secondes et recouvertes de gélose pour dénombrement des germes contenus dans le film. Dans la suite de ce texte, pour une compréhension claire des résultats, le calcul du nombre de germes restant adhérents aux plaques a toujours été effectué de cette manière.

Déroulement des essais en vue de l'évaluation des effets respectifs du séchage et des ultra-sons

Après avoir déterminé la durée d'action des ultra-sons, nécessaire et suffisante pour éliminer la totalité des germes adhérents à la surface souillée et séchée, il convient de vérifier que les ultra-sons n'exercent pas, pendant cette durée, d'action létale sur les germes contenus dans le film de lait séché

ou dispersés au sein d'un liquide. A cette fin, il est nécessaire de déterminer d'abord le nombre total de germes revivifiables après l'action du séchage, puisque nous savons que le séchage exerce une action létale sur les germes., MASUROVSKY et JORDAN, (1958) ; ANGELOTTI et *al.*, (1958) ; NEAVE et HOY, (1947) ; AYNSLEY et BUOL, (1957) ; GARVIE et CLARKE, (1955). Dans cette série d'essais :

— l'évaluation de l'effet du séchage repose sur la comparaison du nombre de germes contenus dans le lait de souillure (nombre témoin) au nombre de germes revivifiables après le séchage.

— L'évaluation de l'effet des ultra-sons repose sur la comparaison du nombre total de germes revivifiables après le séchage, au nombre de germes revivifiables après les actions successives du séchage et des ultra-sons.

— *Dénombrement témoin dans le lait de souillure.*

Ce dénombrement témoin (N) est effectué selon la technique classique en boîtes de Petri sur gélose nutritive (PCA Difco n° 0479).

— *Dénombrement de la totalité des germes revivifiables après le séchage.*

Nous utilisons une technique inspirée de la méthode dite « swab method » (Standard method A P H A 1960), à laquelle nous avons apporté une modification : pour faciliter la récupération, six plaques polies, souillées et séchées sont suspendues dans des béchers contenant 135 ml de liquide de Ringer au quart stérile. Les béchers sont maintenus pendant 15 minutes dans un bain-marie réglé à 8°C ± 0,1°C. La récupération se fait ensuite selon la méthode classique. On effectue un frottis sur la surface de la plaque à l'aide d'un coton humide stérile. Ce frottis s'effectue dix fois dans un sens et dix fois dans le sens perpendiculaire. Puis le coton est immergé dans le liquide où trempait la plaque. Les 135 ml de liquide et le coton sont transvasés dans un flacon stérile de 200 ml et énergiquement agités une cinquantaine de fois. Un dénombrement (Nml) est effectué sur ce liquide. La plaque frottée est égouttée pendant 30 secondes puis recouverte de gélose en vue du dénombrement des germes non éliminés de la surface par le frottis (Nmp).

— *Dénombrement des germes revivifiables après les actions successives de séchage et des ultra-sons.*

Six plaques souillées puis séchées sont soumises individuellement à l'action des ultra-sons pendant 1,5 minute dans des béchers contenant 135 ml de liquide de Ringer au quart stérile. Des dénombrements (Nsl) sont effectués sur ces liquides après 1,5 minute. Après un traitement de 1,5 minute aux ultra-sons les plaques sont égouttées pendant 30 secondes et recouvertes de gélose nutritive en vue du dénombrement (Nsp) des germes non éliminés de la surface.

Déroulement des essais en vue de l'évaluation de l'efficacité de la récupération par frottis (« Swab-test »)

Les manipulations successives sont les mêmes que pour le dénombrement de la totalité des germes après séchage (Nml + Nmp) décrit ci-dessus mais, les plaques ne sont pas trempées préalablement dans un liquide, afin de se conformer à la technique dite « swab-test » décrite par BARNES (1952) et par AYNSLEY et BUOL (1957).

RÉSULTATS

Le nombre négligeable de germes restant sur les plaques après 1,5 minute d'action des ultra-sons montre (tabl. 1) que la totalité des germes contenus dans le film de lait séché est éliminée de la surface.

Les résultats groupés dans le tableau 2 montrent que le nombre de germes revivifiables après le séchage et 1,5 minute d'action des ultra-sons (Nsl + Nsp) est sensiblement le même que le nombre de germes revivifiables après le séchage (Nml + Nmp).

Les résultats groupés dans le tableau 3 montrent que l'efficacité de la récupération par 1,5 minute d'action des ultra-sons est meilleure que celle de la récupération

TABLEAU I

Détermination de la durée d'action des ultra-sons nécessaire pour éliminer les germes adhérents aux plaques métalliques

Séries de plaques	Durée d'action des ultra-sons	Nombre de germes par 25 cm² de plaque	
		Dénombrés dans les liquides Nsl	Non éliminés des plaques Nsp
A	1,5 mn	1,25 10^7	environ 50
B	3 mn	1,25 10^7	environ 50
C	5 mn	1,25 10^7	environ 50

TABLEAU 2

Effets respectifs du séchage et des ultra-sons sur les germes contenus dans le film de lait adhérent aux plaques métalliques

Nombre de germes totaux dans le lait de souillure des plaques (par 0,1 ml de lait) Témoin N	Nombre de germes par 25 cm² de plaque souillée avec 0,1 ml de lait et séchée	
	Dans les liquides de récupération après le frottis des plaques Nml	Non éliminé des plaques Nmp
100 000 000	14 900 000	1 500
Témoin N	Dans les liquides de récupération après action des ultra-sons pendant 1,5 mn Nsl	Non éliminé des plaques Nsp
100 000 000	14 900 000	50

Nml + Nmp : Nombre de germes revivifiables après séchage
Nsl + Nsp : Nombre de germes revivifiables après séchage et action des ultra-sons

par frottis classique (« swab-test »). Par cette dernière technique, on n'élimine de la surface souillée qu'environ 70 p. 100 du nombre de germes revivifiables après le séchage (Nml).

TABLEAU 3

Comparaison entre les dénombrements des germes récupérés par frottis classique (« swab-test ») et par ultra-sons (exprimés en nombre de germes par 25 cm² de plaque)

Essai N°	Nombre de germes revivifiables après séchage (Nml)	Nombre de germes (Nsl) récupérés après 1,5 mn d'action des ultra-sons	Nombre de germes récupérés par frottis classique (« swab-test »)	
			en nombre de germes	en % de Nml
1	$1,50\ 10^7$	$1,50\ 10^7$	$1,10\ 10^7$	73
2	$2,12\ 10^7$	$2,12\ 10^7$	$1,26\ 10^7$	59
3	$5,60\ 10^5$	$5,56\ 10^5$	$4,29\ 10^5$	77
4	$1,58\ 10^7$	$1,54\ 10^7$	$1,08\ 10^7$	70

Nml = Nombre de germes obtenus par la technique de référence : trempage des plaques pendant 15 minutes suivi d'un frottis à l'aide d'un coton puis d'une dispersion par agitation du coton dans le liquide de récupération.

DISCUSSION

Tous les essais effectués sur un film de lait séché adhérent à des surfaces métalliques nous ont permis de constater que :

1° une action de 1,5 minute des ultra-sons est nécessaire et suffisante pour éliminer de la surface métallique la totalité des germes contenus dans un film de lait séché. MASUROVSKY et JORDAN (1960) étudiant l'élimination de *Staphylococcus aureus* séchés sur des plaques métalliques (46°C, 20 minutes) constatent que le meilleur nettoyage est réalisé après 5 minutes d'action combinée d'ultra-sons (40 kHz) et de détergents.

2° Le séchage du film de lait à 37°C et à 20 p. 100 d'humidité relative pendant une heure entraîne une diminution importante du nombre de germes. Les résultats donnés dans le tableau 2 ont été obtenus lors d'un essai effectué sur 6 plaques. Cet essai est représentatif des nombreuses expériences que nous avons effectuées. Toutefois nous avons observé que plus le lait de souillure est contaminé, plus la proportion de germes dénombrés après le séchage est faible. Le séchage après souillure est un problème complexe qui ne semble pas avoir été étudié d'une manière systématique. S'il dure trop longtemps : plus de 20 minutes selon les uns (MASUROVSKY et JORDAN, 1958 ; ANGELOTTI et *al* 1958), plus de 2 heures (NEAVE et HOY 1947 ; AYNSLEY et BUOL, 1957), ou plus de 3 heures (GARVIE et CLARKE, 1955) selon les autres, le nombre de bactéries revivifiables pour les dénombrements ultérieurs en gélose, diminue d'une façon importante et irrégulière selon la nature des germes. Les résultats que nous

indiquons dans le tableau 2 sont en bon accord avec ceux de GARVIE et CLARKE (1955) qui ne trouvent, pour un séchage effectué dans des conditions voisines des nôtres (3 heures à des températures de 30° à 40°C et sous une humidité relative de 30 p. 100) que 14 p. 100 des germes survivants. NEAVE et HOY (1947) ont effectué une dessiccation voisine de celle utilisée dans nos essais (37°C, basse humidité relative, non précisée par les auteurs), dénombrent 25 p. 100 de germes survivants, que le séchage dure 1 heure ou 2 heures. Nous n'avons pas approfondi ce problème du séchage puisque nous ne nous préoccupons que de l'action des ultra-sons sur les germes revivifiables après séchage.

3° Après action des ultra-sons sur film de lait séché, adhérent aux plaques métalliques, on n'observe pas de nouvelle diminution du nombre de germes. La comparaison statistique entre l'effet du séchage seul et l'effet global du séchage et des ultra-sons montre qu'il n'y a pas, entre les résultats obtenus, de différence significative au seuil $P = 0,05$.

En ce qui concerne l'action létale des ultra-sons sur les germes, SOURKOV et *al.* (1960), ont rappelé que les facteurs déterminants de l'action ultrasonique étaient la durée, la fréquence et l'intensité des ultra-sons ainsi que les propriétés physiques du milieu. JACOBS et THORNLEY (1954) ont montré que, dans le lait, l'effet destructeur n'apparaissait que peu ou pas, alors que dans les suspensions en bouillon une action létale était observée. ELLIOT et WINDER (1955) ont fait des observations semblables, une moindre action étant observée sur le lait entier. Il est vrai que ces derniers utilisaient des ultra-sons de haute fréquence et ceux-ci sont destructeurs de bactéries. En effet, d'après HARVEY et LOOMIS (1928) on n'observe de destruction des bactéries qu'aux hautes fréquences (960 kHz) pendant des longues durées (au moins 30 minutes). ROUYER et GRABAR (1947) plus tard, ont montré que les ultra-sons de fréquence 960 kHz, dans des conditions d'essais où l'intensité acoustique était de l'ordre de 6,8 W/cm², détruisaient 97 p. 100 des germes d'une suspension bactérienne après trente minutes d'action. Enfin BEUMER et BEUMER-JOCHMANS (1950) observent les mêmes faits avec des ultra-sons de 1 MHz, mais en précisant qu'à cette fréquence, l'action destructive diminue à mesure que l'intensité acoustique diminue, pour devenir finalement nulle. Malheureusement les auteurs n'indiquent que la puissance acoustique totale (12 watts) sans préciser l'intensité (W/cm²).

JACOBS et THORNLEY (1954) faisant agir des ultra-sons de fréquence 20,5 kHz à faible puissance (intensité non précisée) sur des suspensions bactériennes dans le lait observent une augmentation (après 5 minutes d'action) suivie d'une diminution d'importance variable selon les espèces mises à l'épreuve. HUHTANEN (1966) n'a pas trouvé de différence entre les dénombrements des germes du lait pasteurisé traité aux ultra-sons de fréquence 75 kHz que ce soit pendant 30 secondes, 4,5 minutes ou 13,5 minutes. Dans les essais faisant l'objet de la présente publication, nous avons utilisé un lait de grand mélange pasteurisé et écrémé ; nous avons vu (tabl. 1) que l'on n'observe pas d'augmentation du nombre de germes après 3 ou 5 minutes d'action des ultra-sons. Dans des essais actuellement en cours sur du lait cru entier, nous observons par contre des dénombrements plus élevés après 15 minutes d'action. HUHTANEN explique cette différence par la présence dans le lait cru d'un grand nombre d'amas bactériens.

Comme dans toutes les méthodes bactériologiques utilisant du lait comme liquide de souillure, il conviendra de toujours bien préciser la nature de ce lait.

4° Les ultra-sons agissant pendant 1,5 minute constituent un moyen efficace pour récupérer les germes contenus dans le film de lait séché adhérant à une surface métallique. En effet, on récupère autant de germes que par une méthode mécanique efficace mais longue (trempage de la plaque pendant 15 minutes dans du liquide de Ringer au quart stérile, frottis de la surface et dispersion du coton dans le liquide).

Cependant le frottis classique « swab-test » effectué directement sur le film de lait séché, se révèle beaucoup moins efficace (tabl. 3). BARNES (1952) avait également montré que le « swab-test » conduisait à une récupération incomplète des germes déposés sur des plaques de verre : de 20 p. 100 à 80 p. 100 selon la nature et le nombre de germes.

La technique de récupération par les ultra-sons (80 kHz) est, en outre, beaucoup moins assujettissante puisqu'il suffit d'immerger les plaques souillées et séchées dans le liquide de Ringer, de laisser agir les ultra-sons et de prélever directement dans le liquide en vue du dénombrement des germes.

La manipulation portant sur 6 plaques demande environ 15 minutes. A efficacité égale, la technique par trempage et frottis consécutif demande environ 50 minutes, compte tenu du temps nécessaire à la préparation des cotons.

CONCLUSION

La technique utilisant les ultra-sons pour récupérer les germes contenus dans un film de lait séché sur une plaque métallique est plus efficace que les techniques classiques par frottis, dites « swab-test ». Elle est plus simple et plus rapide.

Une étude complémentaire précisant la nature du lait, la technique de souillure et la durée d'action des ultra-sons permettra de proposer une méthode d'estimation de la souillure retenue par les surfaces métalliques.

Reçu pour publication en septembre 1967.

SUMMARY

THE USE OF ULTRA-SONIC VIBRATIONS FOR THE REMOVAL OF BACTERIA CONTAINED IN A MILK FILM FIXED ON METAL SURFACES

For the cleaning of dairy containers or machines, it is important to know exactly to which extent the metal surfaces were soiled. This estimation is usually based on the number of living bacteria fixed on these surfaces.

The authors employed ultra-sonic vibrations with a frequency of 80 kHz to remove the bacteria fixed on metal surfaces soiled with milk, and then dried. With such a frequency, the total number of bacteria is removed from the plates, by using this technique for 1.5 minute.

During this interval of time, the ultra-sonic vibrations do not injure the bacteria inclued in the dried film milk.

The technique suggested here is more efficient than the classical « swab-test », and also quicker and easier, but it must be carried out with an ultra-sonic vibrations generator.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

American Public Health Association, 1935.

ANGELOTTI R., FOTER M. J., BUSCH K. A., LEWIS K. H., 1958. A comparative evaluation of methods for determining the bacterial contamination of surfaces. *Food. Res.*, **23**, 175-185.

AYNSLEY L. H., BUOL J. M., 1957. A laboratory test for evaluating chemical sterilizers for dairy farms. *J. appl. Bacteriol.*, **20**, 299-304.

BARNES J. M., 1952. The removal of bacteria from glass surfaces with calcium alginate, gauze and absorbent cotton wool swabs. *Proc. Soc. appl. Bacteriol.*, **15**, 34-40.

BEUMER J., BEUMER-JOCHMANNS M. P., 1950. Sur quelques applications des ultra-sons en microbiologie. *Ann. Inst. Pasteur*, **79**, 521-531.

BIQUARD P., 1948. *Les ultrasons*. Presses Universitaires de France, Paris.

COUSINS CH. M., HOY W. A., CLEGG L. T. L., 1960. The evaluation of surface active disinfectant for use in milk production. *J. appl. Bacteriol.*, **23**, 359-371.

DOGNON A., 1953. *Les ultra-sons et leurs applications*. Presses Univ., Paris.

ELLIOTT J. A., WINDER W. C., 1955. Effects of ultrasonic waves on the bacterial flora of milk. *J. dairy Sci.*, **38**, 598.

GARVIE E. I., CLARKE P., 1955. The disinfectant properties of quaternary ammonium compounds and sodium hypochlorite : a comparison of results using different test methods. *J. appl. Bacteriol.*, **18**, 90-106.

HARVEY E. M., LOOMIS A. L., 1928. The destruction of luminous bacteria by high frequency sound waves. *J. Bacteriol.*, **17**, 373-376.

HIGGINS M., 1950. A comparaison on the recovery rate of organisms from cotton wool and calcium alginate wool swabs. *Min. Health and Pub. Lab. Serv.*, **2**, 38-53.

HIRSCH A., MURAS R. E., 1955. A quantitative method for assessing the effects of disinfectants and cleaning agents on bacteria deposited on surfaces. *J. appl. Bacteriol.*, **18**, 425-435.

HUHTANEN C. N., 1966. Effect of ultrasound on disaggregation of Milk bacteria. *J. dairy Sci.*, **49**, 1008-1010.

JACOBS S. E., THORNLEY. M. J., 1954. The lethal action of ultrasonic waves on bacteria suspended in milk and other liquids. *Proc. Soc. appl. Bacteriol.*, **17**, 38-56.

JENNINGS W. C., 1961. A critical evaluation of in vitro radioactive phosphorus additions for estimating soil deposits. *J. dairy Sci.*, **44**, 258-268.

JORDAN W. K., 1966. *The use of radioisotopes in evaluating of surfaces in contact with dairy products*. Seminar Use Radioisotopes, Vienne (sous presse).

KAUFMANN O. W., 1959. A suggested laboratory « use test » for comparing the cleanability of various materials. *J. Milk Food Technol.*, **22**, 35-36.

LISBOA N. P., 1959. A tube test for evaluating agents possessing both detergent ans sterilizing properties 16e *Congr. internation. lait.*, **3**, 1816-1822.

MASUROVSKY E. B., JORDAN W. K., 1958. Studies on the relative bacterial cleanability of milk contact surfaces. *J. dairy Sci.*, **41**, 1342-1358.

MASUROVSKY E. B., JORDAN W. K., 1960. Studies on the removal of *Staphylococcus aureus* from milk contact surfaces by ultrasonic cleaning method. *J. dairy Sci.*, **43**, 1545-1559.

NEAVE F. K., HOY W. A., 1947. The disinfection of contaminated metal surfaces with hypochlorite solutions. *J. dairy Res.*, **15**, 24-54.

ROUYER M., GRABAR P., 1947. Étude du mécanisme de l'action des ultrasons sur les microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, **73**, 215-221.

SAINCLIVIER M., BELLŒIL A., KERHERVÉ L., 1964. Observations sur une méthode de mesure de l'efficacité des solutions de nettoyage en laiterie. 4e *Congr. internation. Détergence, Bruxelles*, C.X 11, 1-12.

SOURKOV V., BARKAN S., GARLINSKAIA E., 1960. Cavitation et modification de structure dans le lait lors de son traitement par les ultra-sons. *Tech. lait.*, **307**, 12-15.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (3), 205-216.

ACTION DES ULTRA-SONS SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DU GLUTEN

I. — Matériel et méthodes

B. GODON et L. PETIT
avec la collaboration technique de Jeanine Ooghe et B. Bargas

Station de Biochimie et Physico-chimie des Céréales et de leurs Dérivés,
C. E. R. D. I. A., Le Noyer Lambert, 91 - Massy
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Les auteurs ont utilisé les ultra-sons dans le but de suivre leur action sur le réseau glutineux et de contribuer ainsi à la connaissance de la structure du gluten par l'appréciation des modifications physico-chimiques qui en résulteraient.

Cette première publication rapporte les conditions expérimentales des techniques de séparation et de traitement, ainsi que les différents tests qui ont permis de suivre les modifications structurales.

I. — INTRODUCTION

La valeur technologique et commerciale des blés découle le plus souvent des propriétés mécaniques des pâtes que leur farine permet de préparer. Ces propriétés elles-mêmes peuvent dépendre de nombreux facteurs mais, en fin de compte, c'est au niveau de la structure physico-chimique des pâtes que se trouvent les fondements de leurs propriétés mécaniques. En fait le gluten est le principal responsable de cette structure et, à bien des égards, il constitue le support des propriétés rhéologiques.

Des moyens divers sont utilisés soit pour aboutir à la connaissance de la structure de cet ensemble complexe qu'est le gluten, soit simplement pour modifier cette structure dans un but pratique. Les méthodes chimiques ou physico-chimiques en forment l'essentiel. Les méthodes physiques et surtout mécaniques par contre sont plus rarement employées et, parmi elles, l'action des vibrations ultra-sonores n'a pratiquement jamais été utilisée. Or, dans d'autres circonstances, celles-ci permirent

une intervention efficace sur la structure de hauts polymères et les résultats obtenus par les différents auteurs de ces travaux peuvent servir de guide dans la prévision de leurs effets sur le gluten.

Dans l'action des ultra-sons, il est classique de distinguer différents aspects : d'une part des actions thermiques, d'autre part des actions mécaniques et électriques, et enfin des actions chimiques — en fait le plus souvent des oxydations — qui peuvent être reliées au phénomène de cavitation.

D'une façon générale les ultra-sons manifestent une action dépolymérisante vis-à-vis des macromolécules soumises à l'irradiation par suite de la rupture des liaisons qui en assurent la structure. C'est ainsi qu'au niveau de la structure microscopique, la cellulose constituée par un enchevêtrement de filaments se trouve résolue en fibrilles individuelles linéaires après traitement par des ultra-sons de 240 kHz (LEVAVASSEUR, TROITZSCH et CHAUME, 1954). Des effets analogues se situent également au niveau des structures moléculaires des protéines ; la viscosité des solutions de gélatine diminue en même temps que son aptitude à la gélification et que son pouvoir rotatoire change (SATA, 1939) ; le poids moléculaire moyen s'abaisse et sa valeur tend vers une limite en fonction du temps de traitement (MOREL et GRABAR, 1950).

Mais dans d'autres cas, c'est à une agrégation que peut conduire le traitement ultrasonore. C'est ce qui a été observé par exemple sur les moûts de bière (SPECHT, 1954) et aussi sur les protéines sériques (LEPESCHKIN, 1949). Celles-ci, traitées à 285 kHz, à pH 7,8, commencent par s'agglomérer en début d'irradiation, avant d'être scindées lorsque le traitement se prolonge ; à pH 5,7, cette phase d'agrégation n'est pas observée. Ce sont probablement de semblables effets qui sont à l'origine de la baisse de solubilité des protéines sériques et de la diminution de leur mobilité électrophorétique observées par d'autres auteurs (HARTMAN et THEISMANN, 1948).

Outre cette action sur les structures macromoléculaires, les ultra-sons peuvent provoquer des modifications chimiques portant sur les petites molécules et en particulier sur certaines molécules d'aminoacides. Il s'agit essentiellement d'oxydations, pouvant aller jusqu'à l'ouverture des cycles aromatiques, comme l'ont montré les premiers PRUDHOMME et GRABAR (1949), dont les résultats furent ensuite confirmés par d'autres chercheurs (STOLZ et SEILD, 1949 ; ZBARSKY, EL'PINER et KHARLANOVA, 1951 ; EL'PINER et SOKOLSKAYA, 1958).

En ce qui concerne le mécanisme des effets ainsi observés, les phénomènes de cavitation sont certainement à l'origine des actions chimiques des ultra-sons (PRUDHOMME, 1957) ; pour certains (GRABAR et PRUDHOMME, 1947 ; DOGNON et SIMONOT, 1955) ils sont également l'agent de dépolymérisations. Cependant d'autres auteurs admettent que ces dernières pourraient avoir d'autres causes : mécaniques, électriques ou thermiques (FITZGERALD, 1952 ; GRIFFING, 1952 ; SETTE et FOX, 1955 ; STANDINGER, 1955). On ne peut qu'être très prudent dans la critique et la comparaison des travaux effectués par les divers auteurs et des conclusions qu'ils en tirent. En effet les modalités expérimentales conditionnent étroitement le rendement du traitement ultra-sonore (DOGNON et SIMONOT, 1955). Par ailleurs l'état de cavitation est capable d'osciller entre deux types différents — cavitation de gaz, cavitation de vapeur — produisant des effets différents, et ceci avec une fréquence dépendant elle aussi de certaines conditions expérimentales (DEGROIS, BALDO et BADILIAN, 1965).

Mais, quoiqu'il en soit, il est certain que les ultra-sons sont susceptibles d'influer sur les propriétés physico-chimiques des protéines et que l'on peut espérer exploiter ce fait en se proposant soit de réaliser certaines modifications des propriétés des protéines, en raison de leur intérêt pratique, soit dans l'intention d'utiliser ces modifications de la structure en vue d'élargir les connaissances que nous avons de celle-ci.

Le but de ce travail a donc été d'explorer les différentes conditions dans lesquelles les ultra-sons pourraient agir sur le gluten et d'apprécier les modifications physico-chimiques qui en résulteraient. Le gluten a été traité soit à l'état natif, soit à l'état de dispersion dans l'acide acétique ; il provenait soit de farines normales de blé, soit de farines privées de leurs lipides ou de leurs protéines solubles, ceci pour préciser le rôle possible de ces constituants dans le comportement du gluten. La gamme des fréquences utilisées s'étend de 190 à 970 kHz. Les tests physico-chimiques ont compris la mesure de la solubilité, de la viscosité, de l'absorption dans l'ultra-violet et la détermination de la composition protéique par chromatographie sur gel de dextrane associée à l'électrophorèse en gel d'amidon.

II. — PRÉPARATION DU MATÉRIEL

Les traitements ultra-sonores ont été effectués sur du gluten provenant d'une farine américaine industrielle, disponible en France, à base de blé *Manitoba*.

1. *Délipidation à froid de la farine*

Afin de limiter les risques de dénaturation des protéines du gluten, la farine a été délipidée à froid ; ce traitement a été réalisé d'une part au moyen de pentane pour éliminer les lipides libres, et d'autre part au moyen de chloroforme pour éliminer autant que possible les lipides liés. La délipidation a été effectuée comme suit : 250 g de farine sont placés dans 500 ml de solvant distillé. Ils sont agités dans un bécher, à la température de la salle pendant 30 mn, dans un appareil magnétique. La suspension est alors centrifugée à 8 000 *g* pendant 10 mn, dans une centrifugeuse thermostatée à 0°C. Après décantation, la partie insoluble est mise dans 500 ml de pentane et agitée pendant 30 mn dans les mêmes conditions. Ce traitement est répété 4 fois. Après la dernière décantation, la partie insoluble est séchée dans un cryodessiccateur, pendant 36 heures. La farine est conservée à — 20°C jusqu'à l'extraction du gluten.

L'efficacité de ces délipidations à froid a été mesurée par titration des lipides restant, extraits par le chloroforme à chaud, dans un appareil de Kumagawa.

Ainsi, dans la farine sèche initiale, le taux de lipides est de 1,43 p. 100. Après délipidation au pentane à froid, il est de 0,64 p. 100 : ainsi 55,9 p. 100 de ces lipides ont été éliminés. Après délipidation au chloroforme à froid, le taux de lipides est de 0,30 p. 100 : 79 p. 100 ont alors été extraits. Le résultat ne peut être qu'approché et, sans doute, en dessous de la valeur réelle parce que, la détermination étant faite sur de très petites quantités de lipides, des erreurs importantes ne peuvent être évitées. En général, la valeur du taux de lipides est augmentée à cause de la présence

de fines particules de farine, même après la filtration du solvant, ce qui augmente le poids de substances sèches extraites. Cette valeur de lipides totaux semble correspondre à la quantité maxima de lipides extractibles à froid.

2. *Extraction des protéines hydrosolubles et salinosolubles de la farine*

Ces extractions, qui ne visent pas à être exhaustives, sont effectuées à la température ambiante, respectivement par l'eau distillée ou par une solution de ClNa 0,5 M.

Pour ce faire, 33,3 g de farine sont mis en suspension dans 132 ml de solvant. Cette suspension est agitée pendant 10 minutes dans un bécher, à l'aide d'un appareil magnétique, puis centrifugée à 8 000 *g* pendant 10 minutes dans une centrifugeuse thermostatée à 0°C. Le culot récupéré est cryodesséché pendant 60 heures puis broyé au mortier par action légère pour ne pas provoquer d'échauffement. La farine obtenue est passée sur tamis AFNOR 0,5 mm-0,2 mm.

L'extraction est caractérisée par un dosage d'azote dans le surnageant et le culot ; l'extrait aqueux contient 8,7 p. 100 de l'azote total et l'extrait salin 12,5 p. 100. On récupère ainsi 98,5 p. 100 de l'azote initial.

Les protéines renfermées dans ces extraits ont été caractérisées par l'électrophorèse en gel d'amidon (FEILLET, 1965) : ce sont des albumines et quelques composants de gliadines dans l'extrait aqueux, seulement des globulines dans l'extrait salin.

3. *Préparation du stock de gluten sec en poudre*

A partir de la farine initiale ou de ces farines traitées, le gluten est extrait de la façon suivante :

une pâte préparée avec 100 g de farine humidifiée par 54 ml d'eau du robinet est lixiviée sous un courant d'eau du robinet à 18° jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de réaction à l'iode. Le gluten obtenu est séché, coupé en petits morceaux et lyophilisé à — 10°C pendant 48 heures. La dessiccation est alors prolongée pendant 1 jour en présence de P_2O_5, la température du gluten étant alors remontée à 0°C. Lorsque le gluten est complètement sec, il est broyé en présence de glace carbonique en prenant soin d'éviter l'échauffement. La poudre obtenue est tamisée sur un tamis 80 L, puis placée dans des ampoules à raison de 10 g dans chacune. Les récipients sont vidés de gaz et remplis de N_2 deux fois de suite, puis ils sont scellés et conservés à — 15°C pendant la durée des expériences.

100 g de farine entière ont donné 12 g de gluten à 5 p. 100 d'humidité résiduelle, mais seulement 10 g de gluten après la délipidation aussi bien au pentane qu'au chloroforme et 14,7 g pour les farines extraites par l'eau ou la solution saline, qui ont donc été relativement enrichies en protides insolubles.

III. — TRAITEMENT AUX ULTRA-SONS

1. *Description du générateur*

Nous disposons d'un générateur Ultrasonic utilisant les céramiques au titanate de baryum. Cet appareil peut fournir la gamme de fréquences suivantes : 190-250-340-412-576-660-740-970 KH. La puissance électrique est de 1 KW. Un milliampère-

mètre permet de repérer la puissance globale de sortie dont le taux est réglé par un potentiomètre, (mais l'appareil en fait ne comporte aucun indicateur d'énergie acoustique dispensée dans le milieu expérimental).

La tension électrique haute fréquence produite par le générateur est appliquée à la céramique de fréquence correspondante. Cette céramique a la forme d'un disque de 7 cm de diamètre et elle est placée à la partie basse d'un pot cylindrique à axe vertical. Ce récipient est rempli d'eau avant la mise en marche du générateur d'ultrasons car les ondes ultra-sonores de cette fréquence sont totalement réfléchies par l'air. Quand la céramique entre en vibrations à la fréquence du champ électrique, un geyser — ou un pic — apparaît à la surface de l'eau, d'autant plus grand que la puissance et la fréquence mises en jeu sont plus élevées ; un aérosol se forme en même temps. En raison de l'énergie mécanique ainsi dissipée, la température du bain augmente rapidement et il est nécessaire de le refroidir énergiquement pour empêcher avant tout d'endommager la céramique. Mais, la surface de la céramique ne vibre pas uniformément : ainsi certaines parties émettent des ondes ultra-sonores très intenses, d'autres, des vibrations très faibles et quelques plages ne produisent aucune vibration. Par conséquent le rayonnement total est très déséquilibré ; il se manifeste par un certain nombre de pics ayant des hauteurs différentes. De plus, la forme et la répartition des pics élémentaires changent suivant la puissance mise en jeu. La distribution des radiations varie d'une céramique à l'autre, c'est-à-dire avec la fréquence. Dans le cas de l'irradiation d'une solution, cette instabilité n'est pas un inconvénient important ; la très grande agitation résultant de l'action des ultra-sons sur la solution provoque indubitablement une excellente homogénéité statistique. Tel n'est pas le cas des échantillons solides comme les plaquettes de gluten et il est alors nécessaire d'assurer une irradiation qui, en un point donné, conserve une intensité constante au cours d'un essai et reproductible d'une expérience à l'autre.

Deux solutions pouvaient être envisagées et ont été expérimentées. La première consiste à repérer un pic élémentaire et à disposer l'échantillon sur son parcours ; la seconde à rassembler les différents pics au moyen d'un miroir concave et à placer l'échantillon au foyer. C'est cette dernière solution qui a été retenue : elle permet d'utiliser tout le rayonnement du transducteur et non pas seulement un pic ; quelle que soit la puissance de sortie et donc la configuration du faisceau ultrasonore, quelle que soit la céramique, l'échantillon est placé en un point fixe, le foyer du miroir. Dans ces conditions la dimension de l'échantillon a été choisie de façon à recouvrir la région focale et à posséder une épaisseur assez faible pour ne pas absorber totalement la radiation incidente. On a ainsi utilisé des échantillons de 18 mm de diamètre et de 3 mm d'épaisseur, correspondant à 250 mg de gluten sec. De plus, comme l'hétérogénéité du rayonnement collecté est la même que celle du rayonnement émis, on a donné à l'échantillon un mouvement de rotation de façon à réaliser une répartition plus régulière de l'irradiation au sein de l'échantillon. Le dispositif est schématisé dans la figure 1.

Le volume total du récipient contenant le transducteur et l'équipement de focalisation est d'environ 10 l. Il est difficile de refroidir un tel volume d'une façon à la fois simple et efficace. C'est pourquoi nous avons immergé dans ce bain général un tube laboratoire de faible capacité (100 ml), dont le fond est constitué par une mince plaque d'acier inoxydable ($e = 5/10$ mm), et dans lequel l'échantillon est plongé.

Alors que la température du grand bain ne peut être amenée au-dessous de 30° quand l'appareil travaille au maximum de puissance, le tube est facilement maintenu à 17°. On évite de cette façon les dénaturations thermiques éventuelles dues à une accumulation de chaleur dans le milieu environnant ; par contre les actions thermiques localisées dans la masse de l'échantillon sont considérées comme faisant partie du phénomène à étudier.

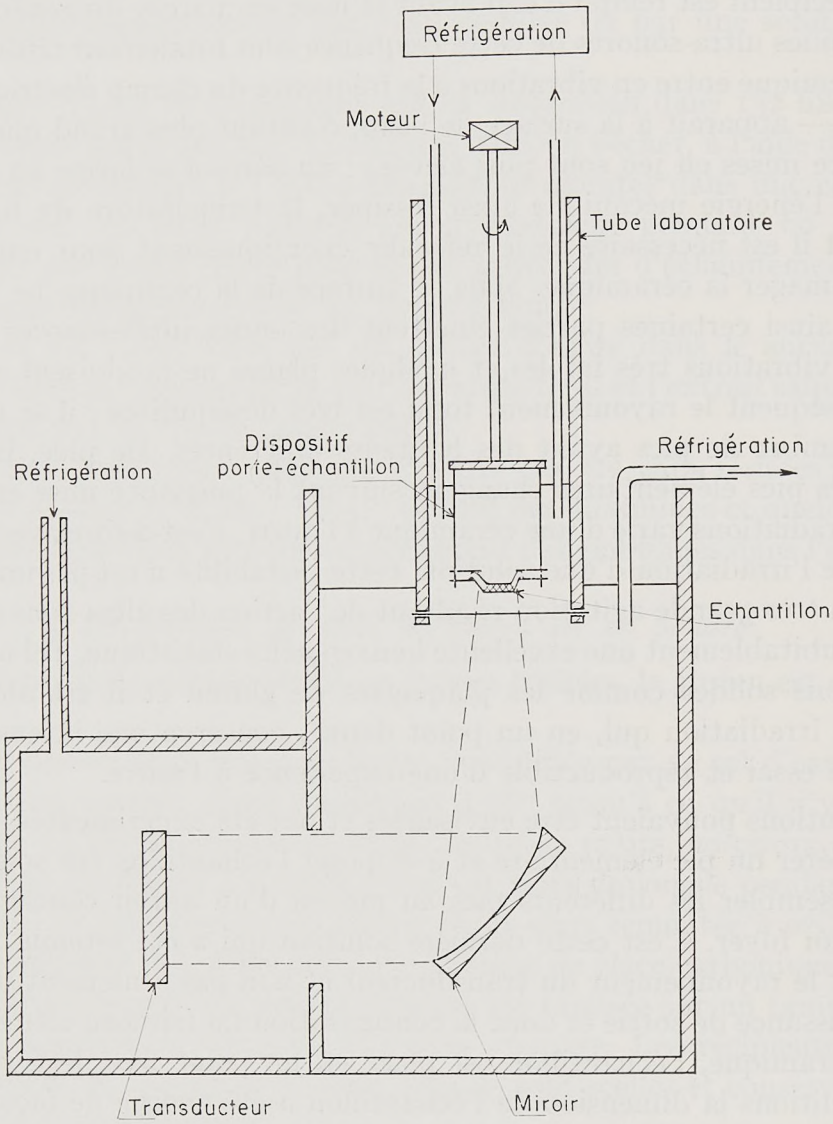


FIG. 1 — *Dispositif pour le traitement ultrasonore.*

2. *Préparation des échantillons pour le traitement ultra-sonore*

Les échantillons sont constitués soit par du gluten natif, soit par des dispersions de gluten dans l'acide acétique.

Gluten natif.

250 mg de gluten en poudre — obtenu comme nous l'avons indiqué plus haut — sont pesés au 1/10 mg dans de petites coupelles d'acétate de cellulose de forme tronconique de 19 mm de diamètre à la base, 7 mm de haut, dont les parois ont 0,2 mm d'épaisseur. La poudre de gluten est répartie de façon homogène

sans tassement excessif. La rehydratation est effectuée en deux étapes : d'abord en phase vapeur puis en milieu liquide. Pour ce faire, les coupelles sont placées dans un récipient contenant de l'eau à sa partie inférieure et dans lequel on fait le vide. Cette phase de la rehydratation dure 2 heures. Après ce temps, la pression étant revenue à sa valeur normale, on recouvre chaque échantillon par 1 ml d'eau distillée, préalablement bouillie et refroidie. En prenant ainsi soin de travailler le plus possible en milieu dégazé, l'humidification est très régulière et donne une masse homogène. Mais cette masse homogène ne possède pas les qualités mécaniques du gluten initial. Aussi est-il nécessaire de la pétrir pour que le gluten retrouve son élasticité. Ensuite pour lui redonner sa forme en plaquette il est compressé pendant 1 heure à 4°C sous une force donnée constante, entre 2 coupelles d'acétate de cellulose identiques, maintenues serrées l'une contre l'autre.

Dispersions de gluten.

Elles sont obtenues à partir des plaquettes de gluten pétri et hydraté comme nous venons de l'indiquer.

Chaque plaquette est placée dans 10 ml d'acide acétique N/100 contenu dans un tube en verre bouché émeri et agitée sur un disque vertical, tournant à la vitesse de 1 tour par minute, pendant 64 heures dans une enceinte à 4°C. Le contenu du tube en verre est transvasé quantitativement dans un tube en nylon pouvant supporter une centrifugation de 20 minutes à 6 000 T/mn (4 500 *g*). L'extrait est récupéré par décantation après centrifugation. C'est cette dispersion de gluten qui sera soumise à l'action des ultrasons.

3. *Exposition aux ultra-sons*

La plaquette de gluten enfermée entre les 2 coupelles d'acétate de cellulose est placée dans le faisceau ultra-sonore au foyer du miroir concave au moyen du dispositif représenté sur la figure 2. Pour cela l'ensemble des 2 coupelles est disposé entre

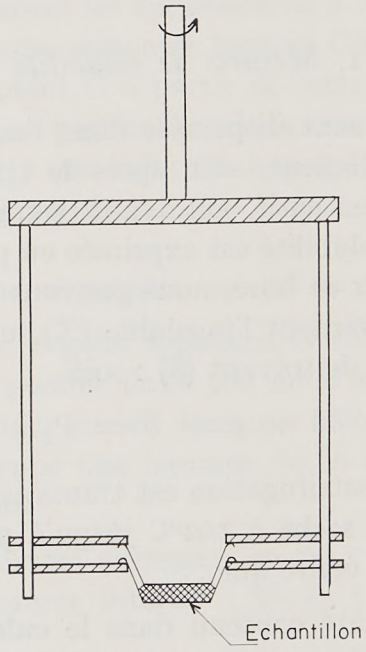


FIG. 2 — *Détail du dispositif porte-échantillon.*

2 petites lames parallèles métalliques, comportant chacune un orifice rond de diamètre un peu plus grand que celui des coupelles. Un dispositif approprié permet de fixer la 2e coupelle à la place voulue par rapport à la 1ere ; le bord de chacune étant un peu plus grand que la partie la plus haute des coupelles. L'ensemble du dispositif est fixé à une 3e plaque métallique parallèle aux 2 autres, munie d'un axe central. Celui-ci maintient les plaquettes immergées dans un tube laboratoire refroidi par une circulation d'eau.

Un petit moteur (non figuré sur le schéma), agissant en bout d'axe, fait tourner l'ensemble du dispositif d'un mouvement lent (1 révolution par minute).

Les dispersions de gluten sont traitées dans un dispositif dérivé du précédent ; les 2 plaques métalliques sont plus espacées de façon à maintenir entre elles un tube d'acétate de cellulose de 20 mm de diamètre fermé à chaque extrémité par une coupelle collée au tube. Ce tube contient 10 ml de suspension de gluten et il est mû d'un mouvement de rotation comme dans le cas précédent. Il est plongé dans le tube laboratoire refroidi.

IV. — TESTS PHYSICO-CHIMIQUES

Les modifications de propriétés physico-chimiques provoquées par les ultra-sons ont été mises en évidence au moyen des techniques suivantes :

— mesures de solubilité,
— mesures de viscosité,
— chromatographie sur gel de dextrane,
— mesures d'absorption ultraviolette et de turbidité,
— électrophorèse en gel d'amidon.

Comme ces méthodes ont été discutées dans des publications précédentes (Godon, de Nuce de Lamothe et Petit, 1964, Godon et Petit, 1967), nous nous contenterons ici de rappeler brièvement les conditions expérimentales.

1. *Mesures de solubilité*

Les protéines du gluten sont dispersées dans l'acide acétique N/100 dans les conditions indiquées précédemment, soit après le traitement ultrasonore lorsque celui-ci est effectué sur le gluten natif, soit avant ce traitement lorsque le gluten doit être traité en dispersion. La solubilité est exprimée en p. 100 de gluten solubilisé par rapport au gluten initial. Pour ce faire, nous pouvons écrire que le culot de centrifugation humide (poids P_1) contient l'insoluble (X), un certain poids de soluté (p) et la quantité correspondante de solvant (S) : soit

$$X + p + S = P_1$$

Le contenu du tube de centrifugation est transvasé quantitativement dans une capsule en verre tarée. Il est séché à 102°C jusqu'à poids constant. Le résidu est pesé (P_2). Nous pouvons alors écrire que :

Insoluble + soluté contenu dans le culot = culot sec

$$X + p = P_2$$

D'où l'on tire le poids de solvant

$$S = P_1 - P_2$$

Sur une partie aliquote de la solution, on détermine le rapport r du poids d'extrait sec au poids de solvant.

D'où : $$p = r \times S$$

On peut calculer alors

$$X = P_1 - (p + S)$$

Si P_0 est le poids de gluten sec mis en jeu, la solubilité est alors :

$$S \text{ p. } 100 = \frac{P_0 - X}{P_0} \times 100 = 100 - \frac{100\,X}{P_0}$$

Les écarts expérimentaux sont d'environ $\pm$ 2.

2. *Mesures de la viscosité*

Les déterminations ont été effectuées à l'aide d'un viscosimètre d'Ostwald, à 25°C $\pm$ 0,01°C. Le tube capillaire a 11 cm de longueur et 0,37 mm de diamètre. Le temps d'écoulement, mesuré au 1/5 de seconde, est d'environ 400 secondes pour l'acide acétique N/100 et atteint 600 secondes pour les solutions les plus visqueuses. Toutes les solutions sont filtrées à travers un verre fritté Pyrex n° 2 (diamètre moyen des pores 40-90 μ). Pour déterminer le nombre limite de viscosité, la solution de concentration la plus élevée C_0 est diluée avec de l'acide acétique qui a été lui-même dilué de telle façon que le pH du mélange ait la même valeur que celui de la solution C_0. Les mesures de pH sont effectuées à 0,005 unité pH près, avec un appareil E. I. L. Dans l'expression des résultats, la valeur de la densité est négligée puisqu'elle est pratiquement constante.

Si les mesures de viscosité ne présentent aucune difficulté particulière, la détermination du nombre limite de viscosité est parfois difficile. En effet, aux faibles concentrations, la courbe représentant les variations de n sp/c en fonction de c comporte un minimum suivi d'une brusque remontée lorsque C tend vers O. Ceci rend impossible toute extrapolation au point O à partir de cette dernière partie de la courbe. Nous négligeons alors cette zone particulière de la courbe qui est probablement due au fait que nous avons affaire à une solution de polyélectrolyte et nous extrapolons la partie de la courbe à pente positive.

3. *Chromatographie sur gel de dextrane*

Pour préparer la colonne, 6 g de Sephadex G 100 (40-120 μ bed form ; Pharmacia, Uppsala) sont mis à gonfler dans 300 ml d'acide acétique N/100 pendant 24 heures. La totalité est ensuite versée dans une colonne de 1,5 cm de diamètre et 70 cm de hauteur où elle occupe une hauteur de 66 cm. Les grandeurs caractéristiques de la colonne sont alors :

volume externe : 40 ml
volume interne : 58 $\pm$ 5 ml

On fait percoler 1 litre d'acide acétique N/100. Un échantillon de 3 ml de dispersion acétique de gluten (contenant environ 45 mg de gluten sec) est introduit sur

la colonne : après imbibition, la colonne est lavée successivement par 32 ml d'eau distillée, 80 ml d'acide acétique 0,02 N puis par une solution ammoniacale 0,02N. La vitesse d'écoulement est maintenue à 6 ml/h par une pompe doseuse ; l'effluent est recueilli par fractions de 5 ml. Les protéines sont détectées par mesure de l'absorption des fractions à 275 mμ.

4. *Mesures d'absorption ultraviolette et de turbidité*

Les spectres ultraviolets sont relevés entre 250 et 400 mμ, sur un Spectronic 505 Bausch et Lamb ou sur un Beckman DK 2A. Lorsque les solutions étudiées sont opalescentes, on corrige les mesures en soustrayant la valeur de la turbidité T. En admettant que les lectures de densité optique effectuées entre 400 et 320 mμ, zone où les protéines ne présentent pas de bandes d'absorption, sont dues à la seule turbidité. On peut extrapoler ces mesures dans la bande d'absorption ; il est commode d'utiliser la relation de RAYLEIGH qui, sous sa forme logarithmique permet une extrapolation graphique linéaire :

$$\log T = \log K - n \log \lambda$$

K et n étant des constantes. On peut alors obtenir le spectre d'absorption vraie. Il est ensuite possible de déterminer le coefficient d'extinction $E^{1\,p.\,100}_{1\,cm}$ à partir de ces mesures en tenant compte de la concentration de la solution déjà déterminée.

5. *Électrophorèse en gel d'amidon*

Cette technique (WOYCHIK et *al.*, 1961) a été utilisée pour examiner soit les dispersions de gluten, soit les produits du fractionnement sur Sephadex. Dans ce dernier cas les effluents correspondant à une même fraction sont rassemblés et cryodesséchés ; le résidu est remis en solution (10 mg/ml) soit dans l'acide acétique N/100, soit dans le tampon lactate d'aluminium. Ce tampon, utilisé pour la préparation du gel, est 0,028 M en lactate d'aluminium et 0,018 N en acide lactique (pH = 3,10 ; conductibilité = 500 micromhos/cm). Le gel contient 12 p. 100 d'amidon. Il a été préparé par chauffage à ébullition commençante de 60 g d'amidon Connaught dans 500 ml de tampon additionnés de 15 g d'urée. Les électrophorèses mettent en jeu 250 à 350 γ de protéines et durent 4 à 5 heures dans un champ de 9-10 V/cm avec une densité de courant de 2,5 mA/cm². La coloration est effectuée par immersion des gels coupés en deux, selon le procédé habituel, dans une solution de nigrosine à 500 mg par litre d'acide acétique à 50 p. 100, à laquelle on a ajouté 750 mg/litre d'EDTA pour empêcher la formation d'un précipité de nigrosine.

V. — CONCLUSIONS

Toutes ces techniques, appliquées soit au gluten entier soit au gluten privé de certains de ses constituants, vont nous permettre de suivre les modifications de la structure physico-chimique dues aux différents traitements ultra-sonores, comme nous l'indiquerons dans les publications suivantes.

Reçu pour publication en septembre 1967.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué avec l'aide financière de l'*U. S. Department of Agriculture* que nous sommes heureux de remercier ici (P. L. 480-UR E9 (10)-44 ; contrat Fg Fr 104).

Nous adressons aussi nos remerciements à l'*European Exchange System District US Forces* à Fontainebleau, qui a bien voulu mettre à notre disposition la farine industrielle américaine nécessaire à cette étude.

SUMMARY

ULTRASONICS EFFECTS ON THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF GLUTEN

The action of ultrasonics upon gluten network was studied in order to bring some new knowledge about the gluten structure by evaluation of its physicochemical alterations.

This first paper reports the experimental conditions under which treatment and analysis operaions were made, as well as different tests used to appreciate structural modifications.

ZUSAMMENFASSUNG

WIRKUNG DER ULTRASCHALLWELLEN AUF DIE CHEMISCH-PHYSIKALISCHEN EIGENSCHAFTEN DES KLEBERS

Die Verfasser haben die Ultraschallwellen verwendet, um ihre Wirkung auf das kleberartige Netz zu untersuchen, mit dem Ziel einen Beitrag zur Kenntniss der Kleberstruktur durch Auswertung der dadurch hervorgerufenen chemisch-physikalischen Veränderungen zu leisten.

In dieser ersten Veröffentlichung werden die experimentalen Bedingungen der Trennungs- und Behandlungsverfahren, sowie die verschiedenen Teste, die die Beobachtung der strukturellen Veränderung ermöglichten, angegeben.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DEGROIS M., BADILIAN B., BALDO P., 1965. Variation de l'absorption de l'énergie ultra-sonore dans quelques solutions en cavitation en fonction de la concentration. *C. R. Acad. Sci*, **261**, 4655-4658.

DOGNON A., SIMONOT Y., 1955. Importance des conditions expérimentales dans l'action des ultra-sons. *J. Chim. phys.*, **52**, 6, 486-489.

EL'PINER I. E., SOKOLSKAYA A. V., 1958. (En russe). Effet des ultrasons sur les acides aminés aliphatiques. *Bio fizika S. S. S. R.*, **3**, 2, 190-196.

FEILLET P., 1965. *Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques.* Thèse de Docteur-Ingénieur, Université de Paris.

FITZGERALD B. G., 1952. Ultrasonic treatment. *Review of acoustical patents.*

GODON B., de NUCE de LAMOTHE M., PETIT L., 1964. Fractionnement des protéines du gluten par filtration sur gel de dextrane. *C. R. Acad. Sci.*, **258**, 2574-2576.

GODON B., RICHARD H., PETIT L., 1967. Étude des protéines du gluten par dispersion dans l'acide acétique et chromatographie sur gel de dextrane Sephadex. I. Méthodes expérimentales. *Industr. aliment. agric.* **1**, 9-15.

GRABAR P., PRUDHOMME R. O., 1947. Action des ultra-sons sur la macromolécule. *J. Chim. phys.*, **44**, 145-153.

GRIFFING V., 1952. The chemical effects of ultrasonics. *J. chem. Phys.*, **20**, 6, 939-942.

HARTMAN F., THEISMANN H., 1948. *Naturwissenschaften*, **35**, 346.

LEPESCHKIN W. W., 1949. *J. phys. Colloïd Chem.*, **53**, 335.

LEVAVASSEUR G., TROITZSCH M., CHAUME G., 1954. Dispersion de la cellulose par les ultra-sons. Observations au microscope électronique. *C. R. Réunion du Groupe Histologie Rayon X.*

MOREL S., GRABAR P., 1950. Relations entre la viscosité, la pression osmotique de solutions de gélatine modifiées par les ultra-sons et la rigidité de leurs gels. *J. chem. Phys.*, **48**, 632.

PRUDHOMME R. O., GRABAR P., 1949. Étude de la dénaturation des protéines. Action des ultra-sons sur les protéines du sérum de cheval normal et sur les acides aminés cycliques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **29**, 1-3, 122-140.

PRUDHOMME R. O., 1957. Action chimique des ultra-sons. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **39**, 4, 425-430.

SATA N., 1939. Uber Die Wirkung von Ultraschallwellen auf die Kolloiderscheinungen. *Kolloid Z.*, **88**, 182-184 et **87**, 186-190.

SETTE D., FOX W., 1955. Assorbimento ultrasonoro. *Ric. Sci.*, **25**, 576.

SPECHT W., 1954. Treatment of plant proteins by ultrasonics. *Branwissenchaften*, **29**, 32.

STANDINGER M., 1955. Uber die Grundlagen der Makromolekularen chemie. *Naturwissenschaften*, **9**, 212-230.

STOLZ S., SEILD G., 1949. Blutveränderungen unter Ultraschall. Ultraschall in der Medizin. *Erlanter Meeling*. Tome I, 475.

WOYCHIK J. H., BOUNDY, J. A., DIMLER R. J., 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 477-482.

ZBARSKY D., EL'PINER I. E., KHARLANOVA M. J., 1951. Action des ondes ultra-sonores sur les acides aminés (en russe). *Dokl. Akad. Nauk, S. S. S. R.*, **77**, 439.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (3), 217-225.

LA MATIÈRE COLORANTE DES GRAINS DE RAISINS DE CERTAINS CÉPAGES CULTIVÉS EN ANJOU EN 1965

A. PUISSANT et Huguette LÉON

Station de Recherches d'Arboriculture fruitière, de Viticulture et d'Œnologie, 49 - Angers
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

L'évolution des anthocyannes dans les raisins de plusieurs cépages cultivés en Anjou est suivie au cours de la maturation à l'aide de mesures spectrophotométriques à 520 mμ. La matière colorante de cépages déterminés est isolée et purifiée. Le colorant extrait permet d'établir une courbe de référence à 520 mμ et de traduire les résultats spectrophotométriques précédemment obtenus en mg d'anthocyannes pour 100 g de baies. Il est alors possible d'examiner l'évolution des anthocyannes au cours de la maturation et de comparer les divers cépages.

INTRODUCTION

La coloration des rosés d'Anjou est obtenue au cours des opérations préliminaires de vinification, foulage, éraflage, macération, pressurage. C'est surtout au cours de la macération que les colorants contenus dans la pellicule passent dans le moût. Divers facteurs entrent en ligne de compte : la durée de l'opération, la température à laquelle elle s'effectue, la quantité d'alcool formé au cours d'un début de fermentation dans la macération à chaud, l'action de l'anhydride sulfureux dans la macération à froid, la teneur en anthocyannes des raisins et leur facilité de migration. Dans la plupart des cas la macération se fait en présence d'anhydride sulfureux afin de bénéficier de ses propriétés antiseptiques, solubilisatrices et antioxydantes. Les conditions selon lesquelles elle peut être conduite sont difficiles à apprécier tant que les teneurs en anthocyannes des raisins, variables d'une année à l'autre selon les conditions météorologiques, ne peuvent être chiffrées et suivies. Cette étude se

propose d'examiner cet aspect du problème, l'évaluation de la teneur en anthocyannes des raisins de divers cépages utilisés pour la vinification des rosés d'Anjou au cours de la maturation. Un travail de ce genre a été fait en 1958 par P. RIBÉREAU-GAYON sur le cépage *Merlot*.

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Prélèvement des grains

Cinq *Vinifera* et un hybride pris à titre de comparaison font l'objet de ce travail. Ce sont le *Cabernet Franc*, le *Gamay Beaujolais*, le *Gamay Chaudenay*, le *Gamay Fréau*, le *Groslot* et le *Baco I*. Au *Cabernet Franc* correspondent deux séries de prélèvements effectués dans des vignobles de situations différentes. L'un *Cabernet B* est situé dans les coteaux du Layon, l'autre *Cabernet BB* fait partie du domaine exploité par la Station.

Les prélèvements sont effectués environ tous les quatorze jours sur six souches préalablement choisies et marquées. Chaque fois, cinquante baies sont cueillies sur chaque souche et sont pesées dès leur arrivée au laboratoire. Chaque lot est ensuite préparé pour l'extraction des anthocyannes. Dans le cas des cépages dont la pulpe du grain n'est pas colorée, *Baco I*, *Cabernet*, *Gamay*, *Beaujolais* et *Groslot*, les pellicules sont séparées du reste par simple pression entre les doigts ; par contre les grains entiers des cépages teinturiers, *Gamay Chaudenay* et *Gamay Fréau* sont légèrement écrasés dans un mortier avant d'être soumis à l'extraction.

Extraction de la matière colorante

La matière colorante de chaque lot, cinquante pellicules ou cinquante baies, est extraite par lavages successifs avec une solution d'acide chlorhydrique à 1 p. 100 en poids dont la température est maintenue à 70°C (P. RIBÉREAU-GAYON, 1964). Les lavages sont arrêtés à partir du moment où la solution n'est plus colorée. Les volumes de solution chlorhydrique utilisés sont inférieurs à 500 ml lorsque les pellicules seules sont mises en œuvre, à 1 000 ml dans le cas des cépages teinturiers. Les solutions d'extraction sont amenées après refroidissement à un volume connu 500 ou 1 000 ml.

Mesures spectrophotométriques

Une partie de la solution est filtrée sur verre fritté. On en prépare éventuellement une dilution avec une solution aqueuse d'HCl à 1 p. 100 afin de pouvoir réaliser la mesure spectrophotométrique sur des cuves d'un centimètre d'épaisseur. La densité optique est ensuite mesurée à 520 mμ à l'aide d'un spectrophotomètre OPTICA simple faisceau (OPTICA CF4).

Isolement et purification des anthocyannes

Environ un litre et demi de la solution aqueuse d'acide chlorhydrique d'extraction est alcalinisé à pH 8,5-9 avec une solution d'ammoniaque à 20 p.100 et additionnée d'une quantité suffisante d'acétate basique du plomb pour assurer sa décoloration (ZAMORANI A. et PIFFERI P.-G. 1964). Le précipité est lavé de nombreuses fois à l'eau distillée. Les eaux de lavage sont filtrées sur verre fritté. A partir du moment où le précipité a tendance à se maintenir en suspension dans l'eau, il est entraîné sur le filtre. Il est ainsi débarrassé des sels de plomb et d'autres impuretés tels que les sucres. On s'assure de l'élimination de ceux-ci en faisant réagir les eaux de lavage avec l'acide picrique en milieu alcalin. Le précipité ainsi purifié est lavé à l'acétone puis séché à une température inférieure à 30° C sous un courant de gaz carbonique dont la pression à l'intérieur de l'étuve est environ 22 mm de Hg. Après dessiccation il est traité par une solution anhydre d'acide chlorhydrique dans le méthanol dans la proportion de 3 g d'acide pour 100 ml d'alcool.

La solution colorée est filtrée sur verre fritté afin d'enlever le chlorure de plomb. Elle est ensuite additionnée d'environ dix fois son volume d'éther. Les chlorures d'anthocyannes précipitent en grande partie accompagnés d'autres corps. Certains composés phénoliques restent en solution dans l'éther ou l'acétate d'éthyle utilisé pour laver le précipité. Celui-ci est alors solubilisé dans le méthanol chlorhydrique à 0,1 p. 100. Une nouvelle précipitation est effectuée dans les mêmes conditions.

Le précipité obtenu est encore impur. Sa solution dans le méthanol chlorhydrique à 0,1 p. 100 chromatographiée sur papier ou sur couche mince de cellulose en deux dimensions avec les solvants (*n*-butanol, acide acétique, eau, 4, 1, 5, phase organique) et (acide acétique, eau, HCl concentré, 15,

82, 3) laisse apparaître aux bases du chromatogramme des produits bruns qui ne correspondent pas aux anthocyannes (R.-M. SMITH, B.-S. LUH, 1965 et T.-C. SOMMERS, 1966). Après essais, la méthode de purification par cristallisation à l'état de picrate est abandonnée. Pour éliminer les impuretés on est amené à faire une double chromatographie sur couche mince de cellulose MN 300 HR épaisseur 0,5 mm. La première application est développée avec le solvant (*n*-butanol, acide acétique, eau 4,1,5, phase organique). Après séchage modéré, la cellulose non colorée ou colorée en brun est éliminée. Le reste est soumis à une élution avec l'éthanol absolu. La solution est introduite dans le ballon d'un évaporateur rotatif. Le liquide est éliminé par distillation sous un courant de CO_2 à une pression d'environ 22 mm de Hg et à une température inférieure à 30°C. Le précipité obtenu est solubilisé dans le méthanol chlorhydrique à 0,1 p. 100. La solution est déposée sur couche mince de cellulose. Le chromatogramme est développé à l'aide du second solvant. Après séchage modéré les parties blanches et brunes sont à nouveau éliminées. Les anthocyannes sont alors éluées par l'éthanol absolu. Le précipité obtenu après évaporation comme ci-dessus est solubilisé dans le méthanol chlorhydrique à 0,1 p. 100. La solution est centrifugée à environ 2 000 *g* pendant 20 minutes et filtrée sur verre fritté n° 5 afin d'éliminer la cellulose. Elle est ensuite additionnée de 10 fois son volume d'éther. Le précipité recueilli sur verre fritté et desséché sous vide ne semble contenir que des anthocyannes à l'état de chlorure comme le montre l'examen chromatographique. Les produits provenant des *Vinifera* ne contiennent que des monoglucosides du delphinidol, du pétunidol, du malvidol, du cyanidol et du paeonidol. Celui qui correspond au *Baco I* renferme en plus des diglucosides.

Sept échantillons de matière colorante sont ainsi préparés à partir des prélèvements exécutés en 1965 et six à la suite de la récolte de 1966. Les produits obtenus sont pesés sur une balance sensible au 1/10 de mg et solubilisés dans le minimum de méthanol chlorhydrique à 0,1 p. 100 (voir tabl. 2). La solution est complétée à un volume déterminé avec de l'acide chlorhydrique à 1 p. 100 en poids. Dans ce même milieu on prépare ensuite des dilutions dont on mesure la densité optique à 520 mμ (voir tabl. 3). Les mesures spectrophotométriques effectuées tous les 10 mμ de 220 à 560 mμ montrent toujours dans les conditions de ce travail un maximum à cette longueur d'onde.

RÉSULTATS

L'évolution du poids moyen de 100 grains au cours de la maturation peut être suivie à l'aide des données du tableau 1. Ce même tableau indique la densité optique moyenne qui serait mesurée sur une solution chlorhydrique renfermant les colorants de 100 g de baies dans 1 000 ml. A cette valeur est associé un intervalle de confiance à 95 p. 100. Ces données sont déduites des résultats de mesures de densité optique relevées sur les solutions d'extraction et des déterminations de poids effectuées à chaque prélèvement.

Le tableau 2 rapporte pour chaque essai de purification le poids de précipité en mg et la teneur des solutions-mères en mg d'anthocyannes par litre. A la suite de la récolte 1966 le poids de produit purifié obtenu pour chaque cépage est plus élevé et assure une plus grande précision de la pesée. Le tableau 3 donne les teneurs des dilutions en mg d'anthocyannes par litre et la densité optique mesurée sur la dilution à la longueur d'onde de 520 mμ.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Échantillons

Afin de tenir compte de l'influence de l'échantillonnage sur les résultats et d'en établir les limites de confiance à 95 p. 100, il est prélevé, au hasard, cinquante grains sur chacune des six souches choisies par cépage. Après mesure de la densité optique

TABLEAU I

Poids des grains — Densité optique des solutions d'extraction des colorants

Cépages	Dates des prélèvements					
	6-9-65	20-9-65	4-10-65	18-10-65	2-11-65	14-11-65
Baco						
Poids de 100 grains	95,0	105,7				
Densité optique	4,429 ± 0,993	8,785 ± 0,852				
Cabernet B						
Poids de 100 grains	68,7	83,7	105,7	113,3		
Densité optique	0,032 ± 0,006	0,703 ± 0,370	2,254 ± 0,613	3,917 ± 0,906		
Cabernet BB						
Poids de 100 grains	81,3	86,3	101,7	117,0	117,7	110,3
Densité optique	0,032 ± 0,018	0,274 ± 0,211	1,408 ± 0,578	2,165 ± 0,699	2,626 ± 0,954	2,496 ± 0,780
Gamay Beaujolais						
Poids de 100 grains	149	177,7	199,3			
Densité optique	0,167 ± 0,060	0,968 ± 0,145	1,958 ± 0,285			
Gamay Chaudenay						
Poids de 100 grains	122	154,3	170,3			
Densité optique	0,986 ± 0,208	3,739 ± 0,763	7,066 ± 0,445			
Gamay Fréau						
Poids de 100 grains	134	144,7	153,7	149,7		
Densité optique	3,846 ± 1,272	9,071 ± 1,350	12,376 ± 1,020	12,392 ± 1,400		
Groslot						
Poids de 100 grains	101	135,3	164,7	170,3		
Densité optique	0,136 ± 0,103	1,280 ± 0,372	3,496 ± 0,883	5,240 ± 1,288		

à 520 mμ de la solution chlorhydrique contenant, dans un volume connu, les colorants de chaque lot de cinquante grains, une valeur moyenne accompagnée d'intervalles de confiance à 95 p. 100 est établie. Ces données sont ensuite calculées pour une solution chlorhydrique contenant dans un litre les colorants de 100 g de baies. Les erreurs relatives sont élevées, au minimum ± 6,3 p. 100, au maximum ± 77 p.100. Ceci est dû aux difficultés d'échantillonnage et dépend, en partie, d'un facteur personnel, mais surtout de l'hétérogénéité de la production des souches et d'une même souche. Ce dernier facteur semble avoir de moins en moins d'influence au fur et à mesure de l'avancement de la maturation.

TABLEAU 2

Teneur des solutions mères en mg d'anthocyannes par litre

Année 1965			Année 1966		
Cépages	Poids de précipité	Teneur des solutions-mères	Cépages	Poids de précipité	Teneur des solutions-mères
Baco	2,6	104	*Baco*	42,6	426
Cabernet Franc	1,2	48	*Cabernet Franc*	14,3	572
Gamay Chaudenay I	6,1	244	*Gamay Beaujolais*	40,6	406
Gamay Chaudenay II	4,7	188	*Gamay Chaudenay*	84,4	844
Gamay Fréau I	2,0	80	*Gamay Fréau*	28,0	1 120
Gamay Fréau II	15,1	604	*Groslot*	13,3	532
Groslot	3,2	128			

Procédé d'extraction

Le procédé d'extraction des colorants contenus dans les pellicules ou les baies utilise une solution aqueuse d'acide chlorhydrique maintenue un certain temps à 70°C (P. Ribéreau-Gayon, 1964). Cette température est nécessaire pour extraire les anthocyannes les moins solubles. Ce traitement risque peut-être de transformer partiellement les leuco-anthocyannes (L. Deibner et M. Bourzeix, 1966). Cette modification est toutefois habituellement réalisée dans des conditions plus énergiques. Les lavages successifs effectués jusqu'au moment où la solution acide ne se colore plus permettent d'extraire la presque totalité des colorants. Les pellicules prennent en général une teinte jaune. Toutefois au fur et à mesure que la maturité avance certaines prennent une couleur brun-rouge et ne cèdent plus de colorants à la solution acide et chaude. L'extraction des anthocyannes semble donc complète.

Purification des anthocyannes

L. Deibner et M. Bourzeix (1963) montrent que l'acétate basique de plomb en milieu alcalin ne permet pas de recouvrer la totalité des anthocyannes d'un vin. Dans ce travail il n'a pas été prévu d'isoler à pH 8,5 - 9 la totalité des colorants mais, une partie représentative, partie qui après purification doit permettre l'établissement d'une courbe de référence.

TABLEAU 3

Teneur des dilutions en anthocyannes. Densité optique à 520 mμ correspondante

Année 1965			Année 1966					
Cépages	Y	X	Cépages	Y	X	Cépages	Y	X
Baco	2,080	0,084	*Baco*	1,704	0,072	*Gamay Chaudenay*	1,688	0,078
	4,160	0,177		2,130	0,088		3,376	0,159
	5,200	0,216		3,408	0,145		4,220	0,200
	10,400	0,431		4,260	0,179		6,752	0,313
Cabernet Franc	1,920	0,080		6,390	0,268		8,440	0,386
	2,400	0,103		8,520	0,358		12,660	0,585
	4,800	0,203		12,780	0,535		16,880	0,775
	9,600	0,415		17,040	0,714		25,320	1,150
Gamay Chaudenay I	2,440	0,133	*Cabernet Franc*	2,288	0,096	*Gamay Fréau*	2,240	0,098
	4,880	0,272		2,860	0,121		4,480	0,198
	9,760	0,531		4,576	0,190		5,600	0,248
	12,200	0,665		5,720	0,238		8,960	0,397
Gamay Chaudenay II	1,880	0,070		8,580	0,352		11,200	0,490
	3,760	0,139		11,440	0,469		22,400	0,973
	7,520	0,271		17,160	0,695	*Groslot*	2,128	0,097
	18,800	0,683		22,880	0,930		2,660	0,121
Gamay Fréau I	3,200	0,110	*Gamay Beaujolais*	1,624	0,075		4,256	0,194
	4,000	0,140		2,030	0,092		5,320	0,244
	8,000	0,284		3,248	0,148		7,980	0,361
	16,000	0,576		4,060	0,188		10,640	0,480
Gamay Fréau II	3,020	0,138		6,090	0,278		15,960	0,711
	6,040	0,273		8,120	0,369		21,280	0,942
	12,080	0,542		12,180	0,549			
	24,160	1,070		16,240	0,734			
Groslot	2,560	0,121						
	5,120	0,243						
	6,400	0,307						
	12,800	0,614						

Y : Teneur des dilutions en milligrammes d'anthocyannes par litre.
X : Densité optique à 520 mμ.

Courbe de référence

Les résultats trouvés, poids d'anthocyannes en mg par litre, densités optiques à 520 mμ correspondantes ne permettent pas de différencier les cépages, mais présentent une liaison d'interdépendance. Le coefficient de corrélation $r = +0{,}990$ indique une relation positive hautement significative entre les données. Dans la régression linéaire $y = a + bx$ où y correspond au poids d'anthocyannes en mg par litre et x à la densité optique mesurée à 520 mμ, le coefficient b qui est très significatif a pour valeur 22,76 et a, 0,05. L'équation de cette droite s'écrit :

$$y = 0{,}05 + 22{,}76\,x$$

Elle permet de déduire de la densité optique à 520 mμ d'une solution, la teneur en anthocyannes correspondante.

TABLEAU 4

Anthocyannes en mg pour 100 g de baies

Cépages	6-9-65	20-9-65	4-10-65	18-10-65	2-11-65	14-11-65
Baco	101	200				
Cabernet B	1	16	51	89		
Cabernet BB	1	6	32	49	60	57
Gamay Beaujolais	4	22	45			
Gamay Chaudenay	22	85	161			
Gamay Fréau	88	206	282	282		
Groslot	3	29	80	119		

A partir des données qui ont servi à l'établissement du tableau 1, il a été possible de connaître les quantités d'anthocyannes contenues dans 100 g de baies. Le tableau 4 montre l'évolution de ces valeurs au cours de la maturation pour les sept cépages examinés.

Comparaison des cépages

Du point de vue technologique il est intéressant de comparer les cépages au moment où les teneurs en anthocyannes pour 100 g de baies sont maximales. L'analyse statistique, compte tenu des différences de variabilité entre cépages, oblige à les classer en deux groupes différents. L'un des groupes comprend le *Cabernet B*, le *Cabernet BB* et le *Groslot*. Après application du test de Duncan, les résultats trouvés pour le *Cabernet B* et le *Groslot* ne sont pas significativement différents alors que le *Cabernet BB* se différencie des deux autres. Le *Cabernet BB* se trouvant dans une zone viticole éloignée de celle où sont cultivés les autres cépages, il est probable que l'influence de ce facteur suffit à différencier les deux *Cabernet*. Pour le moment, compte tenu des données, il n'est pas possible d'affirmer que les teneurs en colorants du *Cabernet B* et du *Groslot* soient différentes.

L'autre groupe comprend le *Baco I*, le *Gamay Beaujolais*, le *Gamay Chaudenay* et le *Gamay Fréau*. Dans ce groupe les cépages diffèrent significativement les uns des

autres. Le *Gamay Fréau* est par conséquent le cépage qui est le plus riche en anthocyannes. Sur ce point sa culture présente un intérêt puisque 100 g de grains apportent 1,75 fois plus de colorants que 100 g de *Gamay Chaudenay Vinifera*, qui le suit du point de vue teneur en anthocyannes. Le *Gamay Beaujolais*, par contre, se montre particulièrement pauvre en colorants.

Appréciation de la récolte 1965

Il est probable que les raisins récoltés en 1965 étaient peu pourvus en anthocyannes. Une telle opinion ne peut se baser sur la comparaison avec d'autres mesures qui font défaut, mais résulte de faits d'observation. A la suite d'années humides et peu ensoleillées, les vins rosés et rouges sont peu colorés. Tel était le cas de l'année 1965. Au tableau 5 se trouvent reportées les sommes de températures moyennes

TABLEAU 5

Données météorologiques relevées du 1/4 au 30/9

	1963	1964	1965
Somme des temp. moy. sous abri	3 169,2	3 396,6	3 108,3
Nombre de jours de pluie	79	52	75
Pluviométrie en 1/10 de mm. . . .	3 283	2 456	3 515

journalières relevées du 1er avril au 30 septembre des années 1963-1964-1965, ainsi que le nombre de jours de pluie et l'importance de la pluviométrie pendant ces mêmes périodes. Le tableau 6 indique les moyennes des degrés à produire, d'acidité

TABLEAU 6

Composition des moûts

Cépages	Années	Degré à produire	Acidité en g d'SO_4H_2/l	Indice de maturité rapport sucre sur acidité
Gamay	1965	8°31	8,6	16,37
	1964	11°74	5,88	34,14
	1963	7°9	8,48	15,98
Groslot	1965	7°96	8,80	15,49
	1964	10°23	5,1	34,29
	1963	7°76	8,76	15,17
Cabernet	1965	8°11	8,77	15,83
	1964	10°98	4,83	38,85
	1963	7°98	7,99	17,77

et d'indice de maturité d'échantillons de moûts de cépages rouges analysés ces mêmes années. Ces indications permettent de situer les récoltes 1963 et 1965 parmi celles où la composition des raisins est défectueuse et la teneur en anthocyannes faible, comme le confirme la couleur des vins.

CONCLUSION

Lors de la période de maturation des raisins de 1965 nous avons pu évaluer la teneur en anthocyannes de 100 g de baies de divers cépages rouges rencontrés en Anjou. Ces résultats peuvent faciliter l'interprétation d'expériences de vinification destinées à améliorer l'extraction de la matière colorante. Ils peuvent aussi contribuer à faciliter le choix de cépages plus riches en colorants que ceux habituellement cultivés dans la région pour la préparation des vins rosés. Il est souhaitable que ces déterminations soient poursuivies au cours d'autres années afin d'essayer de préciser les conditions de la macération.

Reçu pour publication en juin 1967.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier M. Brian de la Station d'Arboriculture fruitière, pour l'aide qu'il nous a apportée au cours de l'interprétation statistique des résultats.

SUMMARY

THE COLOURING MATTER OF GRAPES OF CERTAIN VINES CULTIVATED IN ANJOU IN 1965

The optical densities of hydrochloric acid extracts of the colouring matter of red grapes weer measured at 520 mμ.

The data were expressed per 100 g of the starting material.

The anthocyanins contained in the extracts were isolated and purified. A relationship was then established between the weight and the optical density at 520 mμ which allowed the preceding data to be expressed in mg anthocyanins per 100 g of grapes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Deibner L., et Bourzeix M., 1963. Sur l'extraction des composés polyphénoliques colorés des vins rouges à l'aide de l'acétate de plomb. *Ann. Technol., agric.*, **12** (4), 287-312.

Deibner L., Bourzeix M., 1966. Über die Gesamtextraktion der Anthocyane aus den Schalen von roten Weintrauben. *Mitt. Klosterneuburg*, **16** (3), 200-206.

Riberéau-Gayon P., 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol. vég.* **6**, 119-139, 211-252, 259-282.

Smith R. M., Luh B. S., 1965. Anthocyannin pigments in the hybrid grape variety. *Rubired. J. Food Sci.*, **30** (6), 995-1005.

Sommers T. C., 1966. Wine tannins. Isolation of condensed flavonoïds pigments by gel-filtration. *Nature*, **209** (5021), 368-370.

Zamorani A., Pifferi P. G., 1964. Contributo alla cognascenza della sostanza colorante dei vini. *Riv. Vitic. Enol.*, **17**, 85-93, 115-121.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (3), 227-239.

RECHERCHES SUR LA VINIFICATION DES VINS ROSÉS

J.-P. ROSON

Station d'Arboriculture fruitière, de Viticulture et d'Œnologie, 49 - Angers (1)
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Pour obtenir une coloration suffisante des vins rosés, il est souvent nécessaire de réaliser une courte macération de la vendange foulée, avant le pressurage.

On étudie la coloration de 24 échantillons de vin provenant d'une même vendange de *Cabernet* et pour lesquels on a effectué des macérations en présence de doses différentes de SO_2, dans des conditions variées de température et de durée.

On en déduit une règle dans le but de contrôler ces macérations.

INTRODUCTION

La vinification des vins rosés est habituellement envisagée comme une vinification en blanc des raisins à pellicule colorée, au cours de laquelle le pressurage intervient dès l'arrivée de la vendange à la cave ; le jus recueilli fermente seul en l'absence des pellicules et des pépins.

Lorsque les raisins sont parvenus à un bon état de maturité, ils sont bien colorés et on obtient ainsi des vins suffisamment teintés. Mais, dans les régions les plus septentrionales et lorsque les conditions météorologiques sont défavorables au cours de la maturation, comme ce fut particulièrement le cas en 1965, les pellicules sont pauvres en matière colorante ; cette technique ne donne que des vins à peine teintés ou même incolores. Si l'on veut obtenir un vin rosé, il devient nécessaire d'effectuer avant le pressurage, une courte macération des pellicules dans le moût, ce qui a en outre l'avantage de développer le fruité, qualité toujours appréciée dans un vin rosé.

Afin de préciser les conditions de cette macération, nous avons fait varier, à partir d'une même vendange, les trois principaux facteurs qui agissent sur la dissolution des matières colorantes : la température, la dose d'anhydride sulfureux et la durée.

(1) Nouvelle adresse : Station d'Agronomie et d'Œnologie, 31 - Toulouse.

Il est nécessaire de préciser que ces macérations sont toujours assez courtes et qu'elles se réalisent habituellement avant le départ de la fermentation, c'est-à-dire en l'absence d'alcool.

I — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

On a utilisé une vendange de *Cabernet* franc, récoltée le 8 novembre 1965 ; les raisins étaient légèrement pourris.

La totalité des grappes de 6 souches est recueillie, ce qui donne un poids de vendange de 11,700 kg. Avant la cueillette, un prélèvement de 360 grains, à raison de 60 grains par souche permet de déterminer les caractéristiques du moût :

Acidité totale..... = 7,9 g/l
Sucres..... = 131 g/l, soit : alcool en puissance 7,7°

Il s'agit donc d'une vendange exceptionnellement médiocre. Les grappes sont éraflées à la main, puis foulées et réparties dans 24 ballons de 750 ml, à raison de 400 ml par ballon. Ces derniers sont obturés à l'aide d'un bouchon muni d'un tube étiré.

Les temps de macération effectifs sont de 15 heures, 24 heures, 2 jours, 3 jours 15 heures.

Les macérations se font en présence, soit de 50 mg/l, soit de 100 mg/l de SO_2 ajouté aussitôt après le foulage sous forme de solution sulfureuse 8 p. 100 et dans des conditions de température suivantes : cave : 12°, chambre chaude 20°, étuve : 32°.

Les échantillons sont numérotés conformément au tableau ci-dessous :

SO_2 (mg/l)	50	100	50	100	50	100
Macération 15 heures	1	5	9	13	17	21
Macération 24 heures	2	6	10	14	18	22
Macération 2 jours	3	7	11	15	19	23
Macération 3 j. 15 h.	4	8	12	16	20	24
Température	Cave = 12°		Chambre chaude = 20°		Étuve = 32°	

A l'issue des différents temps de macération, les échantillons sont pressés ; les jus sont ensemencés avec 1 p. 100 de moût en fermentation, puis maintenus dans la chambre chaude à 20°C. Les fermentations sont rapides ; lorsqu'elles sont achevées, les vins sont transvasés dans des fioles de 125 ml, additionnés de 10 mg/l de SO_2 et conservés à la température de la cave.

Toutes ces manipulations sur le moût et le vin se font, autant qu'il est possible, en atmosphère de gaz carbonique, afin d'éviter une oxydation des jus.

Il a été noté un début de fermentation pendant la période de macération dans les échantillons n° 19, 20 et 24.

On a déterminé sur les vins, les densités optiques à 280, 420 et 520 mμ, et l'indice de permanganate, les 18 novembre 1965, 5 janvier et 3 février 1966.

Les mesures des densités optiques sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Optica CF4 d'une part, en milieu HCl 1 p. 100 (18 novembre et 5 janvier), dans le but d'opérer dans des conditions de pH identiques et d'éliminer l'influence de la teneur en SO_2, puis sur le vin tel quel (5 janvier et 3 février).

On utilise des cuves de 10 mm ou de 1 mm pour les vins les plus colorés ; les échantillons sont au préalable filtrés sur verre fritté.

Pour chaque échantillon, on calcule les indices de SUDRAUD (P. SUDRAUD, 1958) :

— somme des densités optiques à 420 et 520 mμ qui exprime l'intensité colorante du vin,

— rapport des densités optiques $\frac{420}{520}$ mμ qui renseigne sur la teinte du vin ; il indique la richesse en colorant jaune par rapport à la richesse en colorant rouge, et par suite, est d'autant plus élevé que le vin a une teinte plus jaune.

Les indices de permanganate sont déterminés selon la méthode de RIBÉREAU-GAYON et MAURIE (1942) qui consiste à oxyder à froid, par le permanganate de potassium, l'ensemble des composés phénoliques du vin.

II — RÉSULTATS

Le tableau 1 reproduit pour chaque échantillon, l'indice de permanganate, et les mesures effectuées aussitôt après la fermentation en milieu HCl 1 p. 100 : densité optique à 280 mμ, somme des densités optiques 420 + 520 mμ, rapport des densités optiques $\frac{420}{520}$ mμ.

TABLEAU I

Densités optiques à différentes longueurs d'ondes et indices de permanganate des vins nouveaux

SO_2 (mg/l)	12°		20°		32°	
	50	100	50	100	50	100
D. O. 280 mμ :						
15 heures	0,362	1,025	1,047	1,238	1,224	1,620
24 heures	0,362	1,053	1,095	1,238	1,620	1,460
2 jours	1,077	1,280	1,445	1,658	1,790	1,960
3 jours 15 heures	1,180	1,333	1,646	1,68	3,048	2,85
IMn :						
15 heures	9,07	9,07	9,07	10,3	10,0	13,0
24 heures	8,77	8,92	9,38	10,0	13,0	13,0
2 jours	8,77	10,9	10,9	13,9	15,12	16,15
3 jours 15 heures	9,68	12,1	13,0	13,9	28,74	23,60
D. O. 420 + 520 mμ						
15 heures	0,150	0,201	0,182	0,268	0,290	0,735
24 heures	0,148	0,204	0,232	0,343	0,629	0,636
2 jours	0,241	0,452	0,517	0,793	0,701	1,011
3 jours 15 heures	0,372	0,577	0,696	0,868	1,110	1,173
D. O. $\frac{420}{520}$ mμ						
15 heures	1,70	0,99	1,01	0,54	0,51	0,33
24 heures	1,62	0,94	0,79	0,52	0,40	0,33
2 jours	0,88	0,47	0,51	0,64	0,38	0,31
3 jours 15 heures	0,55	0,34	0,41	0,35	0,46	0,38

Pour les vins les plus colorés, les D. O. ont dû être déterminées après dilution au 1/10 ; afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux, tous les résultats ont été ramenés à l'absorption qu'auraient donné les vins non dilués sous 1 mm d'épaisseur.

Le tableau 2 indique les résultats de ces mêmes mesures effectuées sur le vin tel quel, le 3 février 1966, soit après deux mois et demi de conservation, au cours desquels les échantillons furent maintenus pendant dix jours à basse température. Les vins ont une teneur en SO_2 libre voisine de 10 mg/l.

TABLEAU 2

Densités optiques à différentes longueurs d'ondes et indices de permanganate des mêmes vins après deux mois et demi de conservation

Températures	12°		20°		32°	
SO_2 (mg/l)	50	100	50	100	50	100
IMn :						
15 heures		4,25	4,0	5,0	4,5	7,5
24 heures		4,25	5,0	5,5	7,25	7,0
2 jours	4,0	5,25	7,5	7,5	8,5	10,0
3 jours 15 heures	5,5	6,25	8,0	8,25	18,5	17,5
D. O. 420 + 520 mμ :						
15 heures		0,037	0,033	0,063	0,071	0,161
24 heures		0,034	0,045	0,063	0,197	0,173
2 jours	0,046	0,112	0,073	0,118	0,237	0,195
3 jours 15 heures	0,078	0,095	0,143	0,123	0,419	0,392
D. O. $\frac{420}{520}$ mμ :						
15 heures		1,27	1,47	1,04	0,89	0,67
24 heures		1,31	1,14	1,03	0,61	0,62
2 jours	1,20	0,65	0,86	0,65	0,58	0,61
3 jours 15 heures	0,95	0,72	0,66	0,65	0,63	0,55

Les échantillons n° 1 et 2 se sont oxydés et n'ont pas été examinés.

Un certain nombre de vins, en particulier tous ceux qui ont macéré à 32°C, ont subi une fermentation malolactique, ce qui a eu pour effet d'augmenter légèrement le rapport des densités optiques $\frac{420}{520}$ mμ. Les pH sont assez constants, autour de 3,05 pour les vins qui contiennent de l'acide malique et de 3,35 pour ceux qui n'ont plus d'acide malique.

III — DISCUSSION

1. — *Premières mesures effectuées dès la fin de la fermentation en milieu HCl 1 p. 100* (tabl. 1).

La D. O. à 280 mμ et l'indice de permanganate qui sont en rapport avec la teneur du vin en polyphénols totaux varient dans le même sens. Les chiffres sont dans l'ensemble d'un niveau assez bas et sont de l'ordre de ceux des vins blancs.

Pour un même temps de macération et une même température, les valeurs sont toujours plus élevées lorsque les macérations ont lieu en présence de 100 mg/l de SO_2 que lorsqu'elles sont effectuées en présence de 50 mg/l. Ceci confirme l'action de l'anhydride sulfureux sur la dissolution des composés phénoliques. De même, la teneur en polyphénols totaux croît avec la température et avec le temps ; les différences restent cependant assez faibles.

Les échantillons n° 20 et 24, pour lesquels il a été constaté un début de fermentation pendant la macération, ont des teneurs en polyphénols totaux nettement supérieures aux autres vins. La présence d'alcool semble donc avoir une influence prépondérante sur la dissolution des composés phénoliques et en particulier des tannins.

Les sommes des D. O. 420 + 520 mμ, ou intensités colorantes, sont toujours plus élevées lorsque les macérations se font en présence de 100 mg/l de SO_2 que lorsqu'elles se réalisent en présence de 50 mg/l. Les variations sont assez sensibles, contrairement à ce que l'on a observé pour les indices de permanganate ou les D. O. à 280 mμ.

Le rapport des D. O. $\frac{420}{520}$ mμ diminue quand la teneur en SO_2 augmente, ce qui indique une teinte plus rouge.

Comme on pouvait s'y attendre, les intensités colorantes croissent dans des proportions assez importantes en fonction de la température. Le temps de macération influe assez peu sur l'intensité colorante, lorsque les macérations se font à basse température, beaucoup plus quand elles ont lieu à température élevée (fig. 1).

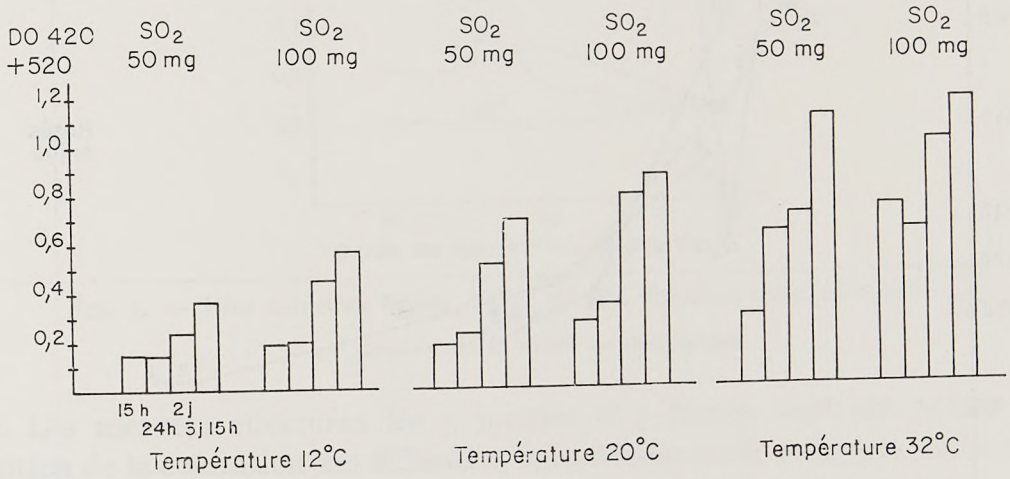


FIG. 1. — *Variation de l'intensité colorante en fonction de la température de macération et de la dose de SO_2*

L'augmentation d'intensité colorante s'accompagne toujours d'une diminution de la nuance, c'est-à-dire d'une diminution de la proportion de colorants jaunes par rapport aux colorants rouges.

On peut expliquer ceci, par le fait qu'à la coloration initiale du jus, de nuance jaune, se superpose une coloration rouge due à la dissolution des anthocyanes.

Les vins peu colorés ont des rapports D. O. $\frac{420}{520}$ mμ élevés ; il ne semble pas cependant que cela traduise une oxydation de la matière colorante, mais plutôt une nuance jaune, naturelle et souvent recherchée dans les vins rosés d'Anjou.

La figure 2 donne une répartition des échantillons d'après l'intensité colorante (D. O. 420 + 520 mμ) et la nuance (D. O $\frac{420}{520}$ mμ).

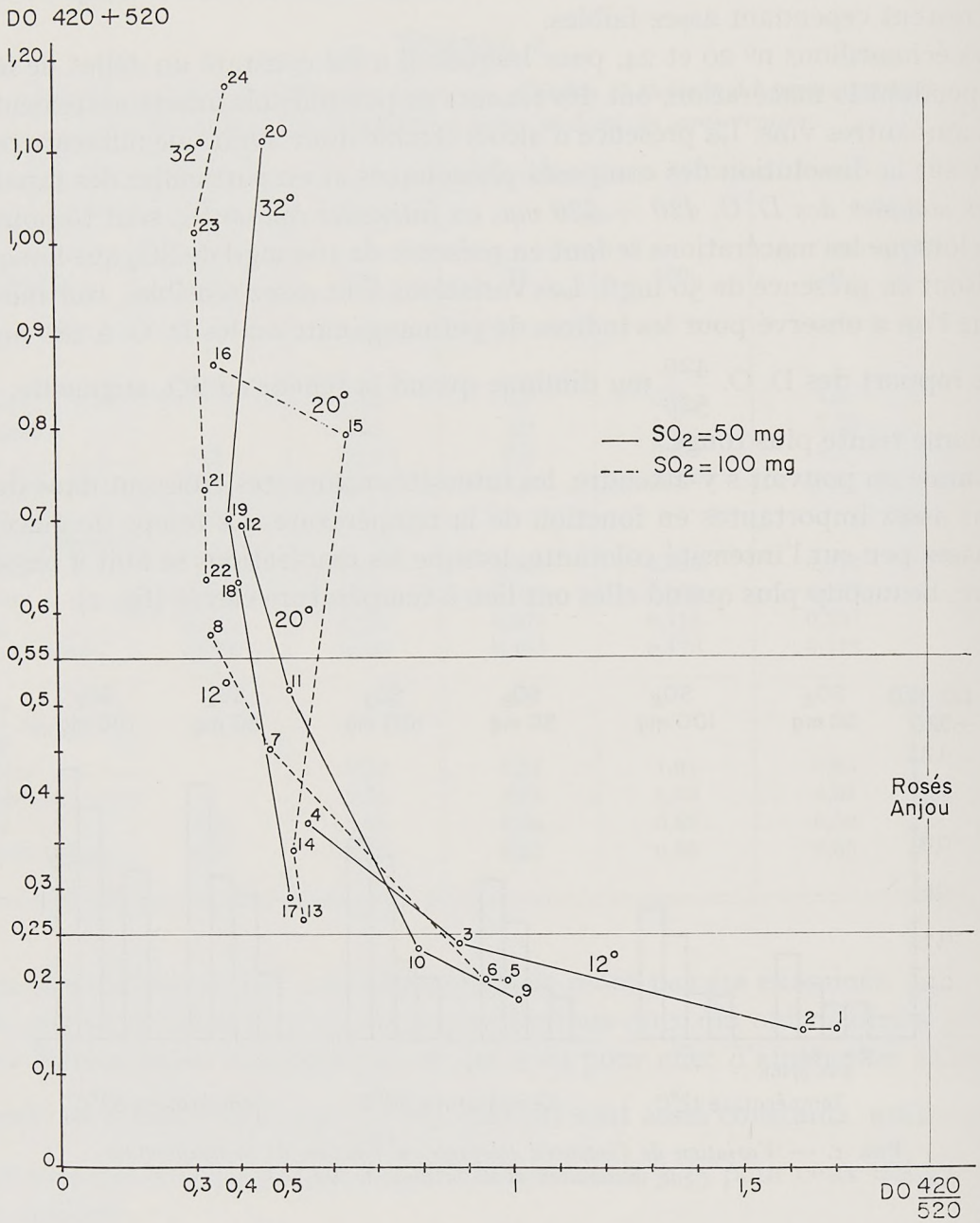


FIG. 2. — *Vins nouveaux milieu HCl 1 p. 100. Intensité colorante en fonction du rapport D. O.* $\frac{420}{520}$

On a relié ensemble les points représentatifs des échantillons qui ont macéré à une même température, d'une part en présence de 50 mg de SO_2/l, d'autre part en présence de 100 mg. On peut ainsi constater que pour des températures de macération élevées, les nuances sont faibles et à peu près constantes.

Les figures 3 A et 3 B indiquent l'évolution du rapport D. O. $\frac{420}{520}$ en fonction du

temps de macération. Sur ces figures (de même que sur la figure 2), l'échantillon 15 représente une anomalie, qui peut être attribuée à une oxydation de la matière colorante.

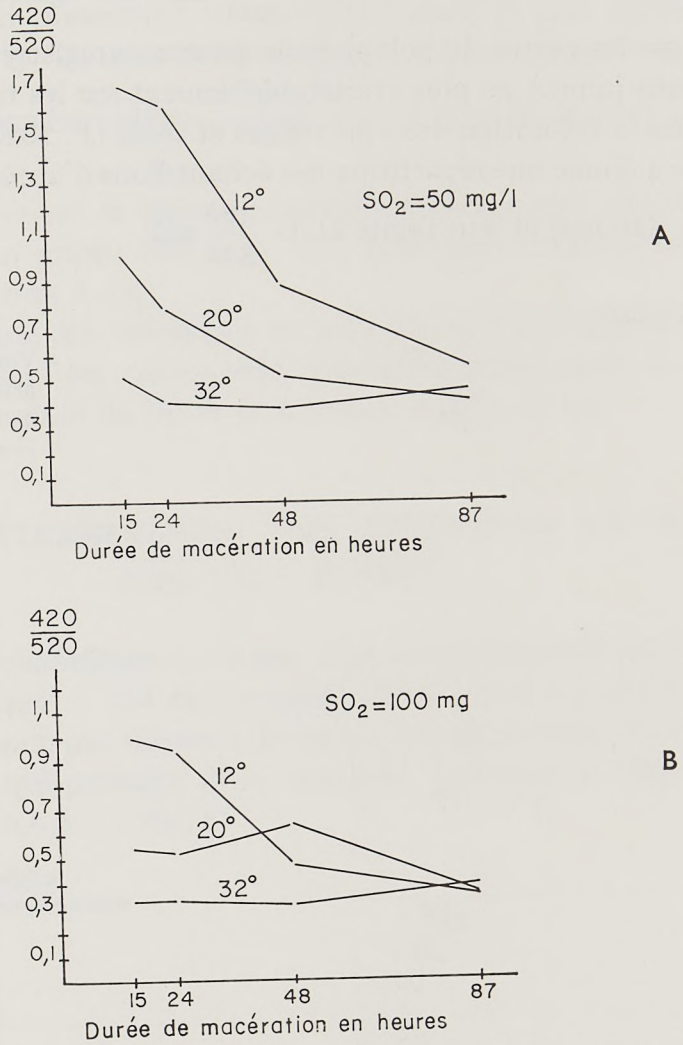


FIG. 3. — *Vins nouveaux milieu HCl 1 p. 100. Évolution du rapport D. O.* $\frac{420}{520}$ *en fonction de la durée de macération*

2. Les mesures effectuées les 5 janvier et 3 février 1966 ont permis de noter l'évolution de la coloration des différents échantillons et de comparer cette coloration à d'autres vins de la même année.

Le 5 janvier, soit après un mois et demi de conservation, les mesures ont été faites d'une part en milieu HCl 1 p. 100, d'autre part sur le vin tel quel. Les valeurs enregistrées pour les D. O. sur le vin nature sont plus faibles et beaucoup plus voisines les unes des autres que celles obtenues en milieu HCl 1 p. 100 ; l'influence des différents facteurs, en particulier de SO_2 est moins apparente.

Il a été noté également, à l'occasion de ces mesures, une tendance plus importante à l'oxydation des échantillons les moins colorés.

3. *3e série de mesures réalisées sur le vin tel quel après deux mois et demi de conservation et un séjour au froid de 10 jours* (tabl. 2).

Les indices de permanganate ont des valeurs inférieures de 40 p. 100 en moyenne aux mesures effectuées 1 mois plus tôt. Ce qui indique une nette précipitation de

matières polyphénoliques. Les sommes de D. O. 420 et 520 mμ ont diminué dans les mêmes proportions.

Les rapports des densités optiques $\frac{420}{520}$ mμ sont également plus faibles, ce qui indiquerait que les pertes de polyphénols totaux enregistrées ont porté d'avantage sur les pigments jaunes, ou plus vraisemblablement sur les tannins qui interviennent également dans la coloration des vins rouges et rosés (P. Ribéreau-Gayon, 1964).

La figure 4 donne une répartition des échantillons d'après leur intensité colorante D. O. (420 + 520 mμ) et leur teinte D. O. $\frac{420}{520}$ mμ.

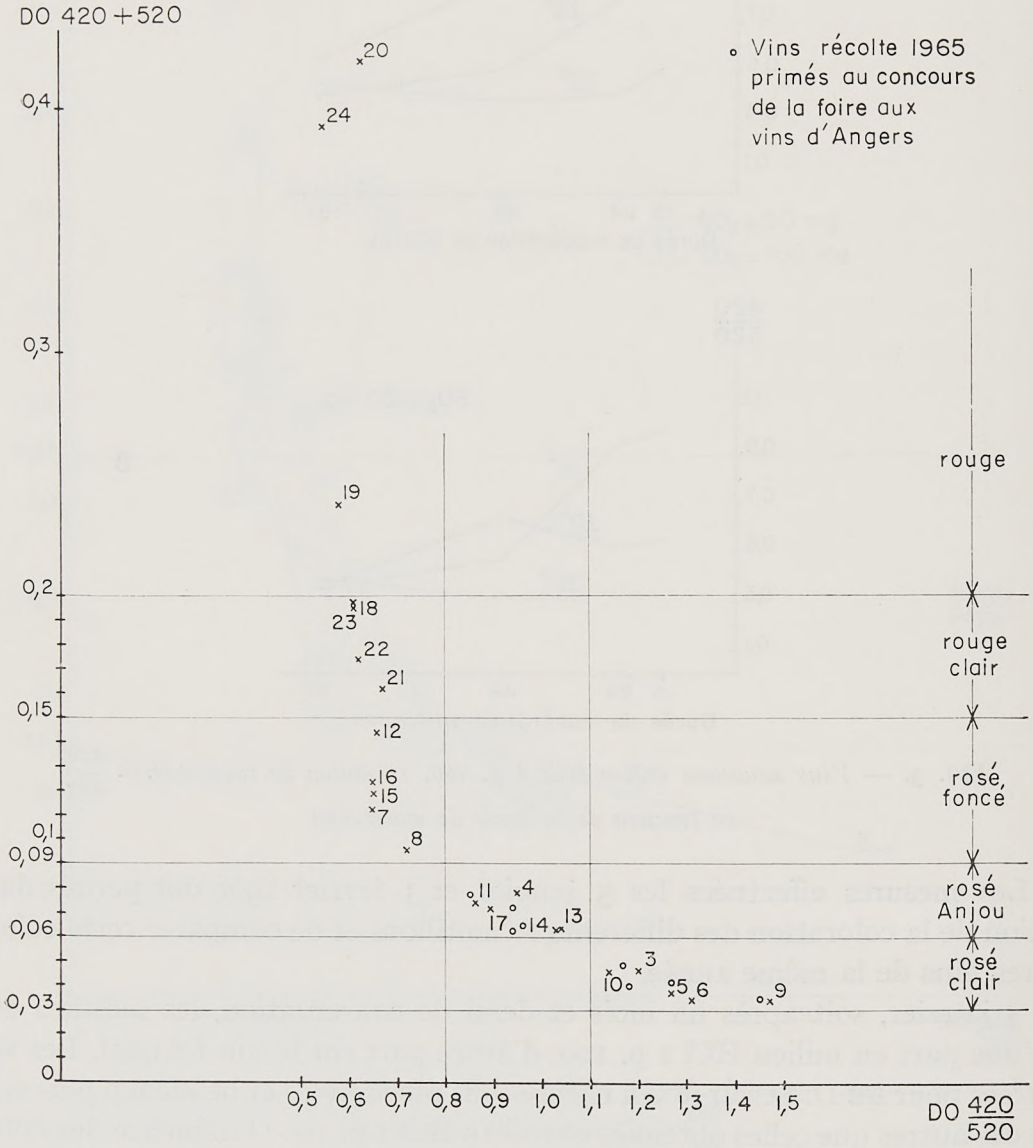


Fig. 4. — *Intensité colorante en fonction du rapport D. O.* $\frac{420}{520}$ *sur le vin tel quel après deux mois et demi de conservation*

L'allure générale de la disposition des échantillons est identique à celle de la figure 2.

On a représenté également l'emplacement des vins rosés de la récolte 1965 primés au concours de la Foire aux Vins d'Angers.

Les intensités colorantes les plus élevées sont relatives aux échantillons n° 20 et 24 pour lesquels un début de fermentation avait été constaté pendant la macération; ils correspondent à un vin rouge de coloration courante dans l'Anjou.

Les échantillons qui présentent la coloration rosée la plus agréable sont les numéros 4, 11, 13, 14 et 17; ils sont compris dans une zone délimitée pour la somme D. O. (420 + 520 mμ) par les valeurs 0,06 et 0,09 et pour le rapport D. O. $\frac{420}{520}$ par les valeurs 0,8 à 1,1.

Ces valeurs, reportées sur la figure 2 concernant les mesures effectuées aussitôt après la fermentation en milieu HCl 1 p. 100, correspondent à une somme (420 + 520 mμ) comprise entre 0,25 à 0,55.

Pour la détermination des conditions de macération, il conviendra en effet de se reporter à cette figure dont les valeurs sont obtenues aussitôt après la fermentation et dans un milieu indépendant du pH et de la teneur en SO_2 du vin.

IV — ESSAI DE DÉTERMINATION DES CONDITIONS DE MACÉRATION DES VINS ROSÉS

Si l'on répartit les échantillons en classes, d'après leur intensité colorante (chiffres du tableau 1) : D. O. (420 + 520 mμ) comprise entre 0,1 et 0,2 puis 0,2 et 0,3, etc., on s'aperçoit qu'ils ne sont pas disposés de façon homogène dans chaque catégorie : on obtient une courbe qui présente deux sommets, l'un pour la classe (0,2 — 0,3) l'autre pour les valeurs 0,6 à 0,8 (fig. 5).

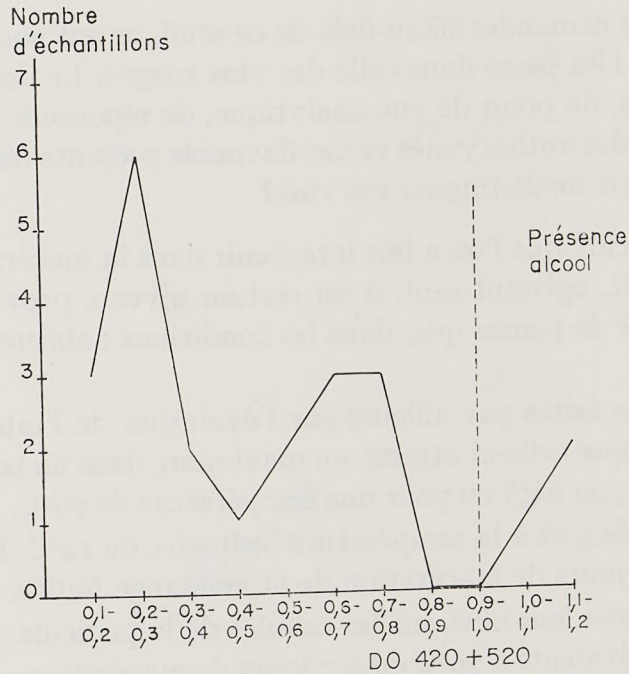


FIG. 5. — *Répartition du nombre d'échantillons en fonction des sommes D. O. 420 + 520* (chiffres du tableau 1)

(Les échantillons qui ont une coloration supérieure à 1, sont ceux pour lesquels il a été constaté un début de fermentation pendant la macération ; celle-ci s'est donc réalisée en présence d'alcool).

L'allure de la courbe conduit à distinguer deux stades dans l'évolution de la coloration du moût pendant la macération.

Il y a d'abord un premier temps au cours duquel l'intensité colorante reste faible et atteint un maximum de 0,3, ce qui représente le double de la valeur initiale. On peut supposer que, durant cette période, les cellules de la pellicule sont encore vivantes et retiennent les anthocyanes dissoutes dans les vacuoles (L. Ferré, 1958).

Au-delà de ce chiffre (0,3), l'intensité colorante croît beaucoup plus rapidement pour atteindre les valeurs comprises entre 0,6 et 0,8 ; la cellule a alors succombé à l'asphyxie et n'offre plus de résistance à la diffusion des anthocyanes.

Ainsi, la coloration est encore faible après 15 heures de macération en présence de 50 mg de SO_2 et à 32°C, elle est celle d'un rosé d'Anjou clair : D. O.(420 + 520) = 0,29. Par contre, dès 24 heures de macération, dans les mêmes conditions de température et de SO_2, l'intensité colorante est deux fois plus élevée : 0,62. Il s'agit alors d'un rosé très teinté.

On peut donc constater que si, au cours de la macération, il peut être intéressant, comme pour l'année 1965, d'atteindre ce seuil de résistance des cellules, il est dangereux de le franchir, car la coloration du moût devient rapidement intense.

En 1965, par suite de conditions climatiques défavorables pendant la maturation, les pellicules étaient pauvres en matière colorante. En année normale, la coloration obtenue au seuil de résistance des cellules doit être beaucoup plus importante que celle qui a été enregistrée.

On peut admettre en règle générale que ce seuil de résistance des cellules constitue une limite qui ne doit pas être dépassée au cours d'une macération destinée à donner un vin rosé.

On peut aussi se demander si, au-delà de ce seuil, on est encore dans la catégorie des vins rosés, ou si l'on passe dans celle des vins rouges. Le dosage des polyphénols totaux n'apporte pas, du point de vue analytique, de réponse à cette question. Peut-être, l'identification des anthocyanes et des flavonols présents dans l'un et l'autre cas pourrait-elle permettre de distinguer ces vins ?

Chacun des facteurs que l'on a fait intervenir dans la macération — SO_2, température, durée — peut, agissant seul, à un certain niveau, provoquer l'asphyxie des cellules. Il est logique de penser que, dans les conditions habituelles, ils additionnent leurs effets partiels.

Des observations faites par ailleurs sur l'évolution de l'intensité colorante ont permis de constater que celle-ci atteint un maximum, dans un temps très court, pour une teneur en SO_2 de 700 mg/l ou pour une température de 70°C.

En l'absence de SO_2 et à la température ordinaire de 12°C, le même résultat est atteint au bout de 7 jours de macération de la vendange foulée.

En ce qui concerne leur effet sur les cellules de la pellicule de *Cabernet*, 700 mg de SO_2 sont donc équivalents à 70°C ou à 7 jours de macération.

Si l'on affecte la teneur en SO_2 (mg/l) du coefficient 1, la température du coefficient 10, la durée en jours du coefficient 100, les trois facteurs sont évalués par des chiffres comparables.

Pour chacun des échantillons de l'expérimentation ci-dessus, on peut ainsi déterminer une somme $M = (SO_2 + \text{Température} \times 10 + \text{Jours} \times 100)$, qui représente

un pouvoir asphyxiant vis-à-vis des cellules des pellicules de la macération envisagée, ou encore un « degré de macération ».

Cette somme varie depuis 230 pour l'échantillon n° 1, à 780 pour l'échantillon n° 24.

On constate que tous les vins pour lesquels l'intensité colorante est inférieure à 0,3 ont une somme M inférieure à 400 (exception faite pour l'échantillon n° 17 qui atteint la valeur 430).

Ce chiffre constitue donc une indication commode qui permet de reconnaître si on est en deçà ou au-delà du seuil d'asphyxie des cellules.

La somme M permet également de fixer les conditions de macération qui correspondent à une coloration donnée.

En effet, si on porte sur un graphique (fig. 6), en abscisse la somme (M) calculée

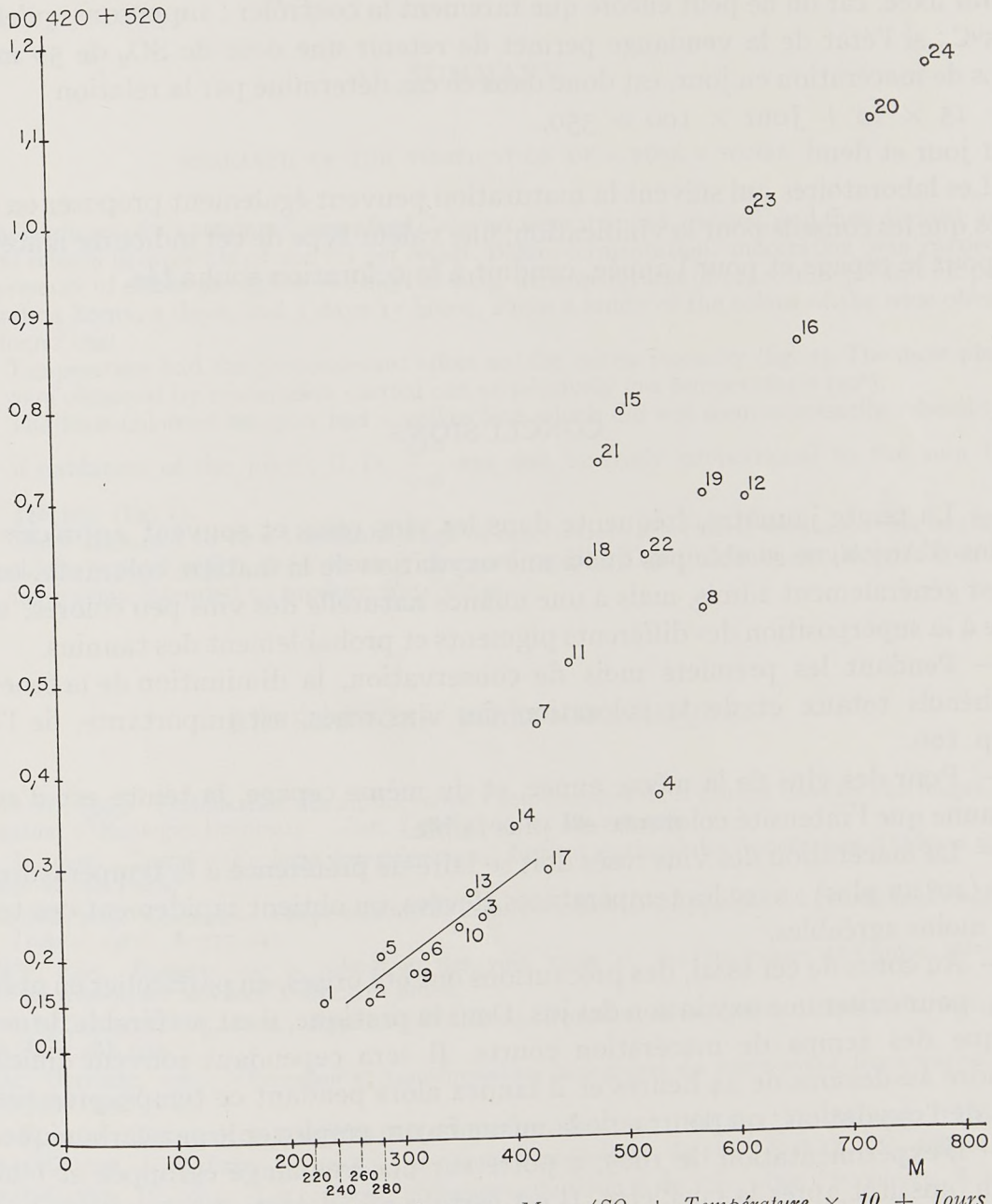


FIG. 6. — *Intensité colorante en fonction de la somme M = (SO_2 + Température × 10 + Jours × 100)* (chiffres du tableau 1).

pour chacun des échantillons, en ordonnée, l'intensité colorante correspondante, on constate que dans la première partie de la courbe, les points sont disposés sensiblement selon une droite ; par contre, au-delà du seuil représenté par le chiffre 400, les points obtenus sont répartis de façon beaucoup plus anarchique.

Il y a donc, jusqu'au seuil de résistance des cellules à l'asphyxie, correspondance entre la coloration du vin et la somme définie plus haut.

Un essai préliminaire au laboratoire peut permettre de déterminer, pour une vendange donnée, certaines conditions de macération qui donnent la coloration souhaitée, et par suite de calculer une somme (M) correspondante. On peut aussi rapporter la valeur du coefficient M à la teneur en anthocyanes des pellicules.

De cette valeur, on déduit différentes conditions de macération valables pour la vendange étudiée.

Par exemple, le chiffre obtenu est de 350 : la température de macération est en général fixée, car on ne peut encore que rarement la contrôler ; supposons qu'elle soit de 15°C ; si l'état de la vendange permet de retenir une dose de SO_2 de 50 mg/l, le temps de macération en jour, est donc dans ce cas déterminé par la relation :

$50 + 15 \times 10 + \text{Jour} \times 100 = 350,$

soit 1 jour et demi.

Les laboratoires qui suivent la maturation peuvent également proposer en même temps que les conseils pour la vinification, une valeur type de cet indice de macération qui, pour le cépage et pour l'année, conduit à la coloration souhaitée.

CONCLUSIONS

— La teinte jaunâtre, fréquente dans les vins rosés et souvent appréciée dans les vins d'Anjou, ne semble pas due à une oxydation de la matière colorante, comme cela est généralement admis, mais à une nuance naturelle des vins peu colorés, consécutive à la superposition des différents pigments et probablement des tannins.

— Pendant les premiers mois de conservation, la diminution de la teneur en polyphénols totaux et de la coloration des vins rosés, est importante, de l'ordre de 40 p. 100.

— Pour des vins de la même année, et du même cépage, la teinte est d'autant plus jaune que l'intensité colorante est plus faible.

— La macération des vins rosés doit se faire de préférence à la température ambiante (20° au plus) ; avec les températures élevées, on obtient rapidement des teintes vives, moins agréables.

— Au cours de cet essai, des précautions ont été prises, en particulier en utilisant le SO_2, pour éviter une oxydation des jus. Dans la pratique, il est préférable de ne prévoir que des temps de macération courts. Il sera cependant souvent difficile de descendre au-dessous de 24 heures et il faudra alors pendant ce temps, préserver les moûts de l'oxydation ; on pourra, de la même façon, employer le gaz carbonique.

— L'expérimentation de 1965, a porté sur une vendange égrappée et foulée à la main, aussitôt après la cueillette. Il est certain qu'en pratique, la nature des traitements que subit la vendange avant la macération influera sur la coloration obtenue.

L'application de ces premiers résultats à la détermination des conditions de macération des vins rosés demande à être vérifiée et complétée au cours des prochaines vendanges ; elle permet cependant d'aborder le problème de la vinification des vins rosés particulièrement délicat dans les vignobles les plus septentrionaux.

Reçu pour publication en juin 1967.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au concours, pour la partie analytique, du Laboratoire d'Œnologie de la Station d'Angers et je remercie Mme Léon pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée.

SUMMARY

RESEARCH OF THE VINIFICATION OF « ROSÉ » WINES

Whole grapes of six strains of ungrafted *Cabernet* were stripped, pressed, and then divided among 24750 ml retorts in amounts of 400 ml per retort. Before fermentation, maceration was carried out in the presence of either 50 mg/l or 100 mg/l of SO_2, attemperatures of 12, 20 and 32° and for periods of 15 and 24 hours, 2 days, and 3 days 15 hours. From a study of the colour of the wine obtained, it was found that :

1. Temperature had the preponderant effect on the colour intensity (fig. 1). The most pleasant shades were obtained by maceration carried out at relatively low temperatures (20°).

2. The least coloured samples had a yellow hue which did not seem necessarily related to the degree of oxidation of the juice ; O. D. $\frac{420}{520}$ mμ was inversely proportional to the sum O. D. 420 + 520 mμ (fig. 2).

3. There appeared to be a threshold stage of maceration, associated with asphyxia of the cells of the pellicle, beyond which the colouring increased rapidly. This threshold should not be overshot during maceration intended to produce *Rosé* wines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Berg H. W., 1963. Stabilisation des anthocyanes. Comportement de la couleur dans les vins rouges. Symp. internation d'Œnologie. Bordeaux. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 247-258.

Ferré L., 1958. *Traité d'Œnologie bourgignonne.* Institut national des Appellations d'Origine des Vins et Eaux-de-vie. Paris.

Flanzy M., Poux Ch., 1958. Les possibilités de la microvinification. Application à l'étude de la macération. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 377-401.

Léon Mme, 1965. Enquête sur la coloration des vins rosés et des vin rouges de l'Anjou. *84e Congr. pour l'avancement des Sciences.* Tours 5,12 juillet.

Mareca I., Gonzalez A., 1965. Apports à l'étude de l'évolution de la matière colorante des vins. *C. R. Acad. Agric.*, **51**, 636.

Marteau, Olivieri, 1965. Obtention et transformation biologiques du moût avant fermentation. *Bull. tech. Inform.* **196**, 27-46.

Nègre E., 1942. Les matières tannoïdes et la composition des vins. *Bull. O. I. V.*, **154**, 20-52 et **135**, 25-56.

Ribéreau-Gayon J., Maurie A., 1942. Les composés phénoliques du vin. *Bull. O. I. V.*, **150**, 60-76.

Ribéreau-Gayon P., 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol. vég.*, **6**, 211-244.

Sudraud P., 1958. Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 203-208.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (3), 241-250.

OBSERVATIONS SUR LA DÉFÉCATION DES VINS DE *VITIS VINIFERA* ET D'HYBRIDES

Essai de différenciation des vins d'hybrides blancs

M. FLANZY et S. AUBERT

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Une observation de laboratoire sur la défécation des vins par le réactif au sulfate mercurique a été multipliée et exploitée en vue de révéler une différence possible entre vins de *Vitis vinifera* et hybrides. Elle fait l'objet d'une étude statistique du phénomène observé.

Ce travail constitue une analyse des perspectives sur l'identification des vins d'hybrides blancs, problème qui n'a pas encore trouvé de solution.

INTRODUCTION

Les travaux de Flanzy M. (1934) et de Flanzy-Thérond (1938-1939) avaient apporté une première contribution à la distinction entre vins de *Vitis vinifera* et vins d'hybrides. Ces recherches portent sur les doses respectives de méthanol et de manganèse existant l'un et l'autre dans tous les vins. Les différences n'étaient pas assez grandes pour établir, sur ces éléments, une méthode de différenciation. Récemment, Gentilini (1966) vient de confirmer la richesse relative des vins d'hybrides en manganèse, mais ne parvient pas à utiliser cette particularité dans leur identification.

Par contre, les travaux de Ribéreau-Gayon, basés sur la recherche d'anthocyanes spécifiques, traçaient une voie prometteuse (1953, 1954, 1956, 1959, 1965 *a*).

De nombreux auteurs ont amélioré cette technique d'identification chromatographique et précisé ses limites d'application ; c'est la méthode officielle de détection des vins d'hybrides rouges actuellement adoptée (Jaulmes et Ney, 1960) ; mais elle

fait l'objet de quelques réserves (BIOL et MICHEL, 1961 ; CAPELLERI, 1965 ; DEIBNER et BOURZEIX, 1960, 1964, 1965 ; KAIN et ARNDORFER, 1965 ; GETOR et PETKOV, 1966).

Quelques auteurs : MARICHAL (1956), ANTONELLI (1964), puis DORIER et VERELLE (1966) ont modifié cette méthode ; ces derniers parviennent à différencier les vins rosés pauvres en anthocyanes.

Actuellement, la présence de malvoside est la seule caractéristique des vins d'hybrides rouges, parmi les plus répandus, qui permette une sélection sur le plan commercial.

Par contre, dans le cas des vins blancs, on ne connaît aucun caractère de différenciation.

KEVEI et SPANYAR (1965) ont effectué une mise au point de ce problème et recherché, sur les vins hongrois d'hybrides blancs, un moyen d'identification.

Reprenant les travaux de BAYER (1958) sur l'examen des substances aromatiques des vins d'hybrides, ces auteurs ont effectué de nombreuses tentatives par chromatographie en phase gazeuse. Les arômes caractéristiques « à goût foxé » des vins *Noah* et *Delaware* ne sont pas décelables sur les chromatogrammes. Ils ne sont pas révélés par des pics caractéristiques ou, alors, dissimulés par des substances plus apparentes et de position voisine.

L'analyse sensorielle permettrait cependant de déceler 10 à 20 p. 100 de vin d'hybride dans un *Vitis vinifera*. Mais ces auteurs ne définissent pas un composé odorant identique pour les hybrides examinés.

On note également, dans les échantillons de vins d'hybrides, une teneur moyenne globale en polyphénols plus forte que dans les *Vitis vinifera*.

A notre connaissance, il n'y a pas eu d'étude systématique sur la nature et les teneurs respectives en constituants phénoliques des vins d'hybrides et de *Vitis vinifera* dans le cas des vins blancs. Ceci est dû au fait que les méthodes de dosage de ces composés sont peu spécifiques et imprécises (RIBÉREAU-GAYON (1957, 1958, 1966)), surtout dans le cas des vins blancs (MASQUELIER, (1963).

Une mise au point des connaissances actuelles sur les colorants des vins blancs a été faite récemment par RIBÉREAU-GAYON (1965 *b*).

Nous avons abordé le problème de la différenciation des vins d'hybrides, à la suite d'une observation de l'un de nous, au cours de défécations à l'aide du réactif au sulfate mercurique en milieu acide.

En effet, si on défèque parallèlement, dans les mêmes conditions, un vin de *Vitis vinifera* (*Morastel*) et un vin d'hybrides (*Seyve-Villard 18315*) par le réactif au sulfate mercurique, la floculation du précipité formé est plus rapide et plus nette dans le cas du *Vitis vinifera*. De plus, si on active la décantation par centrifugation, le liquide surnageant est limpide pour le premier alors que celui correspondant à l'hybride est très trouble. Pour ces deux vins, tous deux initialement très colorés, la différence est extrêmement nette.

Le même essai effectué sur deux vins blancs, de même provenance et année, vinifiés dans les mêmes conditions, *Grenache* et *Seyve-Villard 12375* (Pech-Rouge, 1965, I. N. R. A., Narbonne, Aude), conduit aux mêmes phénomènes : d'un côté, un liquide surnageant parfaitement limpide, de l'autre, un trouble appréciable. Ces résultats ont été le point de départ de nos travaux.

On peut penser, en premier lieu, à une action sélective de l'agent de précipitation sur les matières tannoïdes du vin.

SEMICHON et FLANZY (1926) avaient déjà signalé l'action moins rapide du réactif au sulfate mercurique sur les matières colorantes jaunes ou incolores des vins.

De même, les travaux de NÈGRE (1939, 1942, 1945) mentionnent la richesse relative des vins blancs en polyphénols « non tanins », ceux-ci étant évalués par la différence entre polyphénols totaux et polyphénols précipités par l'acétate de zinc. Ils constituent un des premiers essais de différenciation qualitative des vins par la voie envisagée.

BIOL et FOULONNEAU (1963) ont étudié comparativement la décoloration des vins rouges au moyen de sels métalliques (zinc, mercure, plomb) ; il apparaît des différences de comportement entre les vins de divers types. Les vins d'hybrides et les teinturiers sont, d'une manière générale, plus difficiles à précipiter que les autres.

DEIBNER et BOURZEIX (1963 *b*) ont chiffré dans le cas du *Seyve-Villard 18315* la fraction polyphénolique non déféquée par l'acétate basique de plomb. Ils constatent que 10 p. 100 environ de malvoside, vraisemblablement sous une forme particulière, reste en solution dans le milieu.

D'autre part, on sait par l'expérience quotidienne et les observations faites par les auteurs précédemment cités, que les vins d'hybrides ont une coloration particulièrement résistante, même en présence d'excès des réactifs de défécation.

On a observé également, d'une manière générale, au niveau de la commercialisation, que les vins d'hybrides blancs madèrisent plus facilement que les autres au cours de la conservation.

On peut espérer que cet ensemble de données peut conduire à un moyen de différencier ces vins, même lorsque leurs teneurs en matières tannoïdes sont faibles ; c'est le cas des vins blancs et rosés.

Nous avons essayé de mettre au point un test d'appréciation visuelle en normalisant les conditions d'observation des différences d'aspect des liquides déféqués.

Nous l'avons appliqué à une soixantaine de vins de différents cépages et régions, vinifiés selon les techniques les plus courantes.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Le réactif mercurique est préparé selon la méthode de SÉMICHON et FLANZY (1926).

Dans une solution sulfurique (38 ml SO_4H_2 dans 250 ml d'eau), on ajoute sans refroidir 60 g d'oxyde mercurique. Cette addition est faite très progressivement en agitant pendant 4 heures. On laisse ensuite au repos 24 heures et on filtre. Ce réactif est incolore et acide (pH = 0,5 au papier Merck).

Le test de différenciation est appliqué sur les bases suivantes :

A 50 ml de vin contenu dans un erlenmeyer de 100 ml, muni d'une agitation mécanique (barreau magnétique), on ajoute goutte à goutte le réactif mercurique :

5 ml dans le cas des vins rouges,
3,5 ml dans le cas des vins rosés,
2,5 ml dans le cas des vins blancs.

Cette addition doit être régulière ; elle est faite en deux minutes environ.

On complète à 55 ml, avec de l'eau. Puis on laisse au repos 15 minutes à température ambiante (15 à 25°C). Le liquide déféqué est versé, avec son précipité, dans un godet de centrifugation en verre ; celui-ci est fermé par un bouchon vissé.

On centrifuge 4 minutes à 2 500 tours/minute.

L'observation s'effectue, dans le godet, sur le liquide surnageant. Dans tous les tests effectués, on a examiné en parallèle, un vin de *Vitis vinifera* et un vin d'hybrides de façon à établir la comparaison.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus sont rassemblés dans les tableaux 1, 2, 3. Le tableau 4 donne le bilan par catégories de vins et le bilan par type de cépage.

TABLEAU I

Vins vinifiés en rouge

N°	Origine	Année	Cépage	Type *Vitis vinifera* — Hybride	Liquide surnageant Limpidité (—) trouble (+) douteux (×)
1	Pech-Rouge, (Aude) Station I.N.R.A. Narbonne	1965	*Morastel*	*V*	—
2	—	1965	*S. V. 18315*	H	+
3	—	1965	*Carignan*	*V*	×
	—	1964	*Carignan*	*V*	—
4	—	1963	*S. V. 18315*	H	+
5	—	1959	*Terret gris*	*V*	—
6	—	1963	*S. V. 7053*	H	+
7	—	1959	*Clairette grise*	*V*	×
8	—	1964	*Cinsault* (goutte)	*V*	—
9	—	1963	*Aramon*	*V*	×
10	—	1965	*Grenache noir*	*V*	—
11	Fronton (Hte-Garonne) Station I.N.R.A. Toulouse	1965	*Alicante Bouschet*	*V*	×
12	—	1965	*Couderc 7120*	H	×
13	—	1965	*Gamay-Fréau*	*V*	—
14	Cave Coopér. Rabastens (Tarn) Station I.N.R.A. Toulouse	1965	*Seibel*	H	×
15	Fronton (Hte-Garonne) Station I.N.R.A. Toulouse	1965	*Grand noir de la Calmette*	*V*	—
16	D'Orléans à Cellette (Sologne) Station I.N.R.A. Blois	1965	*S. 7053* (2/3) + *5455* (1/3)	H	+
17	—	1965	*Gamay* (Beaujolais + 5 % Fréau)	*V*	×
18	Liger à Chitenay (Sologne) Station I.N.R.A. Blois	1965	*S. V. 12426* + *S. 8357*	H	×
19	Gendrier-St-Claude-s-Diray (Sologne) Station I.N.R.A. Blois	1965	*Baco n° 1*	H	+
20	Cave Coopér. St-Georges-du-Cher (Sologne) Station I.N.R.A. Blois	1965	*Baco n° 1* + *Terras* (15 %)	H	×
21	Cours par Cosne (Nièvre) Station Exp. viticole	1965	*853-R 16 E. M.*	H	+
22	—	1965	*Seibel 5455*	H	—
23	—	1965	*S. V. 39522*	H	—

DISCUSSION ET CONCLUSION

Si on élimine les cas douteux,c'est-à-dire très léger louche dans le milieu, le bilan global peut être résumé sur l'ensemble des vins :

Vins de Vitis vinifera :

cas limpides = 68 p. 100 } soit 2 vins sur 3 « limpides »
cas de trouble = 32 p. 100

Vins d'hybrides :

cas limpides = 11 p. 100 } soit 9 vins sur 10 « troubles »
cas de trouble = 89 p. 100

TABLEAU 2

Vins vinifiés en rosé

N°	Origine	Année	Cépage	Type *Vitis vinifera* — Hybride	Liquide surnageant Limpidité (—) Trouble (+) Douteux (×)
1	Cave Coopér. St-Georges-du-Cher (Sologne) Station I.N.R.A. Blois		*Gamay* (Beaujolais) + *Groslot* (50 %)	*V*	+
2	Rétif (Beauce) Station I.N.R.A. Blois		*S. 7053*	H	×
3	Cave Coopér. St-Georges-du-Cher (Sologne) Station I.N.R.A. Blois		*Groslot*	*V*	+
4	Ligér à Chitenay (Sologne) Station I.N.R.A. Blois		*S. 7053* + *S. 13666* (50 %)	H	+
5	Cours par Cosne (Nièvre) Station Exp. viticole		*Pinot noir*	*V*	—
6	—		*Gamay*	*V*	—
7	Hérail, Coursan (Aude) Station I.N.R.A. Narbonne		*S. V. 18315*	H	+

Les hybrides examinés ont une tendance marquée à donner le phénomène de trouble par défécation.

Cette caractéristique ne peut constituer un critère d'identification analytique. Mais, elle peut éventuellement servir de base à une sélection des vins, du moins dans des limites restreintes.

TABLEAU 3

Vins blancs

N°	Origine	Année	Cépage	Type *Vitis vinifera* — Hybride	Liquide surnageant Limpidité (—) Trouble (+) Douteux (×)
1	Pech-Rouge (Aude) Station I.N.R.A. Narbonne	1965	*Terret blanc*	*V*	—
2	—	1965	*S. V. 12375*	H	+
3	—	1965	*Grenache blanc*	*V*	—
4	—	1960	*S. V. 23657*	H	+
5	—	1961	*Clairette*	*V*	—
6	—	1961	*S. V. 12375*	H	+
7	—	1960	*Terret noir*	*V*	×
8	—	1960	*S. 12413*	H	+
9	—	1965	*Grenache blanc* (vinifié en rouge)	*V*	—
10	—	1960	*S. V. 12375*	H	+
	—	1965	*S. V. 12375*	H	+
11	—	1959	*Aramon*	*V*	×
12	—	1960	*S. V. 2318*	H	×
13	—	1965	*Terret noir* (avec SO_2)	*V*	+
	—	1965	*Terret noir* (sans SO_2)	*V*	+
14	Cours par Cosne (Nièvre) Station Exp. viticole	1962	*Chasselas*	*V*	+
15	—	1965	*S. 4-986*	H	+
16	—	1965	*Sauvignon blanc*	*V*	×
17	—	1965	Hybride *932-E. M.*	H	+
18	—	1965	Hybride *895-3-E. M.*	H	×
19	Évin-Mettray (I. et Loire) Laboratoire départemental d'analyse de Tours	1965	Semis Hybrides	H	+
	—	1962	*R. 6*	H	+
	—	1964	*S. 11803*	H	×
20	Paqueteau-Richard/Luynes (Indre-et-Loire) Laboratoire départemental d'analyse de Tours	1965	*S. V. 5-276*	H	+
	—	1964	*S. V. 5-276* demi-sec	H	+
	—	1964	*S. V. 5-276* moelleux	H	—
21	Corset à Chitenay (Sologne) Station I.N.R.A. Blois	1965	*S. V. 5-276*	H	+
	Liger à Chitenay (Sologne) Station I.N.R.A. Blois	1965	S. *V. 5-276*	H	+
	—	1965	*S. V. 5-276* (50 %)	H	+
22	D'Orléans à Cellette Station I.N.R.A. Blois	1965	*Sauvignon*	*V*	+
23	Labbé à St-Claude-de-Diray (Sologne) Station I.N.R.A. Blois	1965	*Baco 22 A*	H	+

Les principales objections à formuler sur ce test sont, d'une part le nombre important de cas douteux et, d'autre part la faible intensité du trouble surtout dans le cas des vins blancs.

TABLEAU 4

Type	Nombre échantillons	Examen du liquide surnageant			Pourcentage — trouble (+ douteux)
		Limpide	Cas douteux	Trouble	
Rouges					
V. vinifera	12	7	5	0	0 à (42 %)
Hybrides	12	2	4	6	50 à (83 %)
Rosés					
V. vinifera	4	2	0	2	50 %
Hybrides	3	0	1	2	66 à (100 %)
Blancs					
V. vinifera	11	4	3	4	36 à (63 %)
Hybrides	20	1	3	16	80 à (95 %)
Total					
V. vinifera	27	13	8	6	22 à (52 %)
Hybrides	35	3	8	24	68 à (91 %)

Dans le but de rendre plus net le test étudié, diverses modifications au mode opératoire ont été essayées :

— l'augmentation ou la diminution de la dose primitive de réactif mercurique dans les limites de :

2,5 à 6 ml pour les vins rouges,
2,5 à 5 ml pour les vins rosés,
1 à 5 ml pour les vins blancs

n'apporte rien. Les variations de turbidité sont infimes.

— L'élévation modérée de température fait apparaître plus fréquemmnt le trouble du liquide surnageant, aussi bien dans le cas des vins d'hybrides que dans celui des vins de *Vitis Vinifera*. Mais, un abaissement de la température n'amène pas d'amélioration.

— Divers essais sur les facteurs : temps de repos, vitesse d'addition du réactif, vitesse et durée de centrifugation, température, concentration du réactif, ne nous ont pas permis de réduire le nombre de cas douteux.

Ces tentatives constituent un premier effort dans le but d'améliorer le test proposé. Il est vraisemblable que d'autres facteurs liés au cépage, aux conditions de culture, aux traitements de la vendange et du vin, jouent un rôle aussi important que ceux sur lesquels il est possible d'agir analytiquement. Ils peuvent faire l'objet de recherches plus méthodiques. Mais l'objectif essentiel visé est de bien situer le problème sans perdre de vue son éventuelle application pratique. On peut cependant faire quelques remarques sur les divers échantillons examinés.

L'influence des facteurs technologiques ne paraît pas évidente ainsi que le montre l'examen des tableaux, 1, 2, 3.

— L'influence du vieillissement du vin n'apparaît pas.

— La grande majorité des vins étudiés ont été vinifiés en laboratoire et proviennent d'une vendange éraflée ; il est peu probable que les constituants des rafles interviennent dans les phénomènes observés.

— La présence ou non d'anhydride sulfureux ne joue pas sur l'exemple du *Terret noir*, vinifié en blanc (série 7 et 13).

— Dans la catégorie des vins blancs, un seul vin d'hybride (n° 20 *Seyve-Villard 5276*, moelleux) donne un liquide surnageant limpide. Deux autres échantillons de même origine, mais vinifiés différemment, donnent un trouble (le vin demi-sec est assez peu marqué). Il faudrait vérifier l'influence éventuelle du facteur sucre.

On peut ainsi en multipliant les essais et par divers recoupements, envisager d'éliminer ou de situer les facteurs pratiques responsables du phénomènes de trouble.

Que peut-on dire sur la nature des substances responsables des troubles ?

Bien que le cas du *Seyve-Villard 18315*, le plus marqué, et des autres hybrides rouges le laissent supposer, on n'a pas observé de relation entre la teneur en diglucosides anthocyaniques et l'intensité du trouble. Mais cela n'élimine pas cette possibilité. Il est possible que seules certaines formes, ou associations, privilégiées de diglucosides interviennent ; et, d'une manière générale, les vins rouges donnent les troubles les plus importants ; ce sont les plus riches en composés phénoliques.

De plus, le cas des vins blancs n'est pas nécessairement un démenti à cette hypothèse dans la mesure où l'on connaît mal la composition exacte des pigments jaunes des vins blancs. Il ne faut pas exclure non plus la possibilité de troubles de plusieurs origines, liés à des propriétés innées ou acquises du vin.

Dans des recherches ultérieures, on s'attachera à vérifier si les substances responsables des troubles caractéristiques sont effectivement de nature phénolique. Les travaux cités et les observations faites montrent que c'est l'hypothèse la plus plausible. On sait aussi que dans tous les cas une fraction mercurique sous une forme non identifiée s'insolubilise lentement par abandon du milieu à l'air.

Il est moins probable sur l'ensemble des échantillons examinés que le phénomène de trouble, assez général, soit attribuable à d'autres composés protéiques, pectiques, mucilagineux ou minéraux lentement précipités en présence d'excès d'agent défécant. Le réactif au sulfate mercurique devrait les éliminer en grande partie directement. Le milieu très acide dans lequel on se trouve est particulièrement peu favorable à l'apparition de troubles de cette nature après la défécation.

Reçu pour publication en septembre 1967.

SUMMARY

OBSERVATIONS ON THE CLARIFICATION OF WINES FROM « VITIS VINIFERA » AND FROM HYBRIDS. AN ATTEMPT TO DIFFERENTIATE THE WINES OF WHITE HYBRIDS

Differentiation between wines from hybrids and wines from *Vitis vinifera* is particularly delicate and difficult, especially in the case of white wines. There is a marked tendency of all wines from hybrids, red or white, to be more difficult to clarify using mercuric sulphate after SEMICHON and FLANZY. There is either less complete or slower decoloration, and a characteristic cloudiness persists after centrifuging.

After various experiments it was still not possible to show more clearly the differences in behaviour between wines from hybrids and wines from *Vitis vinifera* during clarification. The identification of the substances responsible for these phenomena, which could possibly characterize the wines of white hybrids, could be directed towards colourless or yellow phenolic compounds. The selective effect of the precipitation agents such as mercuric salts may be useful in this research. In this way, one can hope to find characteristics common to the hybrid vines and to distinguish them from those of *Vitis vinifera* which are the only ones authorized for the production of accredited wines and which coincide often in quality with those of a vintage.

RESUMEN

OBSERVACIONES SOBRE LA DEFECACION DE LOS VINOS DE « VITIS VINIFERA » Y DE HIBRIDOS ENSAYOS DE DIFERENCIACION DE LOS VINOS D'HIBRIDOS BLANCOS

La diferenciación de los vinos de hibridos y de *Vitis vinifera* es particularmente dificil sobre todo en el caso de los vinos blancos. Una observacion de laboratorio indica une tendencia frecuente de los vinos de hibridos, rojos o blancos, de ser defecados mas dificilmente por el reactivo al sulfato mercúrico de SÉMICHON-FLANZY ; se observa un descoloramiento menos cumplido o menos rapido y persistencia de una opacidad característica despues centrifugación de la mezcla.

Varios ensayos no han permitido de poner en claro las diferencias entre vinos de hibridos y de *Vitis vinifera* durante la defecación.

La identificación de los compuestos responsables de aquellos fenómenos, las cuales podrian eventualmente caracterizar los vinos de hibridos blancos, puede ser orientada hacia los compuestos fenolicos incoloros o amarillos. La selectividad de los reactivos de precipitación como los sales mercúricos es un medio que tienen que ser examinados en esta investigación. Se puede esperar de este modo descubrir algunos característicos comúnes a las variedades de vid hibrida y distinguirlas de las de *Vitis vinifera* unicamente autorizadas para los vinos con apelación.

RIASSUNTO

OSSERVAZIONI SULLA DEFECAZIONE DEI VINI DI « VITIS VINIFERA » E DI IBRIDI. SAGGIO DI DIFFERENZIAZIONE DEI VINI DI IBRIDI BIANCHI

La differenziazione dei vini di ibridi e di *Vitis vinifera* é particolarmente difficile soprattutto nel caso dei vini bianchi.

Tutti i vini di ibridi rossi o bianchi sono più difficilmente defecati mediante il reativo al solfato di mercurio di SÉMICHON e FLANZY, cioè presentano una decolorazione meno completa o meno rapida e un torbido caratteristico persiste dopo centrifugazione.

Parecchi saggi non hanno permesso di rendere più nette queste differenze di comportamento di certi vini di *Vitis vinifera* e di ibridi durante la defacazione.

L'identificazione delle sostanze responsabili di questo fenomeni, che potreberro eventualmente caratterizzare i vini di ibridi, puó essere avviata verso le sostanze fenoliche incolore o gialle.

L'azione selettiva degli agenti di precipitazione, tali i sali di mercurio, è un mezzo che si deve esaminare in questa ricerca. In questa via si puó sperare trovare qualche carattere comune agli ibridi produttori e cosi distinguergli dei *Vitis vinifera* che sono, soli, autorizzati per la produzione dei vini a denominazione e che coincidono spesso con una delle qualità di un vino.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANTONELLI F., 1964. Riconoscimento cromatografico di vini provenienti da ceppi ibridi produttori diretti *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, **9**, 375-379.

BAYER E., 1958. *Vitis*, **1**, 298, (d'après KEVEI E., et SPANTAR P., *Industr. aliment. agric.*, **82**, 1157-1166).

BIOL H., MICHEL A., 1961. Étude chromatographique des vins rouges issus de cépages réglementés. *Ann. Technol. agric.*, **10**, nº 4, 325-337 et 339-344.

BIOL H., FOULONNEAU Ch., 1963. Décoloration des vins rouges par certains sels de métaux lourds. *Ann Technol. agric.*, **12**, n° 1, 27-38.

CAPPELLERI G., Ricerca della malvina nei vini di *Vitis vinifera*. *Rivista di Viticoltura di Enologia*, Conegliano., **18**, n° 8, 350-355.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1960. Sur les incertitudes dans la différenciation des cépages *Vitis vinifera* et d'hybrides rouges par chromatographie sur papier de leurs substances colorantes. *C. R. Acad. agric. Fr.*, **46**, 968-971.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1963. Sur l'extraction des composés polyphénoliques colorés des vins rouges à l'aide de l'acétate de plomb. *Ann. Technol. agric.*, **12**, n° 1, 287-312.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1964. Recherches sur la détection des anthocyanes diglucosides dans les vins et les jus de raisin, (par chromatographie sur papier et fluoriscopie des taches obtenues). *Ann. Technol. agric.*, **13**, 263-282.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1965. État actuel de la détection des anthocyanes diglucosides dans les vins et les jus de raisin. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, **58**, 107-109, et 666.

DEIBNER L., BOURZEIX M., CABIBEL-HUGUES Mme M., 1966. Sur la valeur analytique de l'isolement des anthocyanes des vins et des jus de raisin au moyen des acétates de plomb et des résines échangeuses d'ions. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, **669**, 39-47.

DORIER P., VERELLE L. P., 1966. Nouvelle méthode de recherches des diglucosides anthocyaniques dans les vins. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, **669**, 1-10.

FLANZY M., 1934. *L'alcool méthylique dans les liquides alcooliques naturels*. Thèse, Toulouse, Imprimerie Régionale, 84-86.

FLANZY M., THÉROND L., 1938. Le manganèse dans les vins de *Vitis vinifera* et dans les vins d'hybrides. *Ann. Technol. agric.*, **1**, 67-76 ; 1939. *Rev. Vitic.*, **90**, 435-454.

GENTILINI L., 1966. Sulla possibilita o no che il manganese sia un rivelatore naturale di vini I. P. (Sur la possibilité ou l'impossibilité que le manganèse soit un révélateur naturel des vins provenant d'hybride.) *Riv. Vitic. Enol.*, **19**, n° 3, 83-91.

GETOR G., PERKOV G., 1966. Analyse de la teneur en malvine des variétés du *Vitis vinifera*. (en russe). *Gradin Loz. Nauk.*, **3**, 271-278.

JAULMES P., NEY J. M., 1960. Recherches des vins d'hybrides rouges par chromatographie de la matière colorante. *Ann. Falsif. Fraudes*, **616**, 180. *J. O.* 20 septembre 1963, p. 4 582. (Arrêté du 24 juin 1963). Méthodes officielles d'analyse des vins et des moûts.

KAIN W., ARNDORFER H., 1965. Contribution à l'identification de producteurs directs dans les vins rouges. *Mitt. Klosterneuburg., Série A*, **15**, n° 3 123-127.

KEVEI E., SPANYAR P., 1965. Recherches sur l'identification des vins hongrois d'hybrides blancs. *Industr. aliment. agric.*, **82**, 1157-1166.

MARICHAL M., 1956. Caractérisation des vins issus d'hybrides producteurs directs, par chromatographie simplifiée. *Ann. Falsif. Fraudes*, **568**, 155.

MASQUELIER M. J., 1963. Dosage des leucoanthocyanes du vin blanc. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **102**, 51-52.

NEGRE E., 1939. Comment distinguer les vins rosés et les vins de café des vins rouges. *C. R. Acad. agric.*, **18**, 650.

NEGRE E., 1942. Les matières tannoïdes et la composition des vins. *Bull. O. I. V.*, **22**, 52.

NEGRE E., 1945. *Contribution à l'étude des matières tannoïdes du vin*. Thèse, Strasbourg.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1958. *Analyse et contrôle des vins*. Librairie Polytechnique, Ch. Béranger, 318-230.

RIBÉREAU-GAYON P., 1953. Différenciation des matières colorantes des raisins et des vins des cépages français et hybrides. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **39**, 800.

RIBÉREAU-GAYON P., 1954. Étude de la matière colorante des raisins rouges : application à la différenciatin des cépages et des vins. *Ann. Falsif. Fraudes*, **47**, 436.

RIBÉREAU-GAYON J., 1956. Observations sur la différenciation de la matière colorante des vins rouges., *Ann. Falsif. Fraudes*, **49**, 382.

RIBÉREAU-GAYON P., 1957. Le leucocyanidol dans les vins rouges. *C. R. Acad. Agric.*, **43**, 821-823.

RIBÉREAU-GAYON P., 1959. *Recherches sur les anthocyanes des végétaux* (*Application au genre vitis*). Thèse Bordeaux.

RIBÉREAU-GAYON R., 1965. *a*) Nouvelles observations sur la différenciation des vins de *Vitis vinifera* et d'hybrides. *C. R. Acad. Agric.*, **59**, 135-140.

RIBÉREAU-GAYON R, 1965. *b*) La couleur du vin. *Bull. Soc. sci. Hyg. aliment.*, (L'Alimentation et la Vie). **53**, n° 10, 11-12.

RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1966. Dosage des tanins dans les vins rouges et détermination de leur structure, *Chim. anal.*, **48**, n° 4, 178-186.

SÉMICHON L., FLANZY M., 1926. Recherches sur la défécation des liquides sucrés par les sels mercuriques. *Ann. Falsif. Fraudes*, **208**, 208-226.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (3), 251-268.

POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DES POLYPHÉNOLS. CARACTÉRISATION POTENTIOMÉTRIQUE DES CONSTITUANTS PHÉNOLIQUES DU JUS DE POMME ET DES BOISSONS

B. MONTIES

Laboratoire de Chimie biologique,
École nationale supérieure agronomique, 78 - Thiverval-Grignon
Institut national de la Recherche agronomique

INTRODUCTION [1]

L'une des plus anciennes méthodes de dosage des polyphénols, celle de NEUBAUER et LOVENDAL (MUNTZ, 1888), est encore employée comme méthode officielle ; c'est une « méthode de choix pour les dosages rapides » (ROBERTS, 1962). Le permanganate est utilisé comme oxydant en milieu acide (pH < 2), aqueux et dilué ; la fin du titrage est indiquée par le virage d'un colorant (carmin d'indigo) qui permet de réaliser une oxydation partielle des polyphénols.

Le mécanisme même de cette réaction n'a pas été étudié en détail. Il est certain que selon les conditions, les composés intermédiaires et les produits de réaction sont différents (ROBERTS et BARUA, 1940 ; KING et BOTTOMLEY, 1945).

En 1952, WILLIAMS a étudié la stœchiométrie de ce dosage ; il a calculé le nombre d'atomes d'oxygène équivalents à divers polyphénols. On constate, d'après ses résultats, que ces valeurs sont voisines de nombres entiers et que le nombre d'atomes nécessaires pour oxyder les polyphénols complexes (acide chlorogénique, catéchine) est égal à la somme de ceux qui sont nécessaires pour oxyder leurs éléments. Le même calcul, fait sur les données de NÈGRE (1945), confirme cette observation.

On a supposé que la formation de *o*-quinones intermédiaires pouvait expliquer ces faits ; on a choisi de caractériser ces composés électroactifs par potentiomètre. On a donc cherché à réaliser l'oxydation permanganique de façon réversible parce que l'interprétation des courbes de titrage permet de caractériser le système oxydo-réducteur dosé. On a choisi l'*ortho*-dioxybenzène (*ortho*-diphénol) comme substance

[1] Travail effectué à la Station de Technologie végétale, 78 - Versailles

modèle parce que cette fonction est commune à la majorité des polyphénols dosés ici (MONTIES, 1966 *a*). On a comparé ensuite deux séries de dérivés substitués, hydroxylés et carboxylés, de l'*ortho*- et du *para*-diphénol. Ce mode de titrage, enfin, a été appliqué à la caractérisation des constituants polyphénoliques des boissons, la méthode potentiométrique rend l'analyse plus objective.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

On a employé un « titreur : appareil de titration automatique Radiometer » qui permet d'enregistrer le potentiel d'électrode en fonction du volume du titrant ajouté ; il comporte un enregistreur (SBR 2) et une burette automatique (ABU 1) à seringue; l'unité de contrôle est le titreur (TTT 1). L'apport de titrant est asservi à la variation de potentiel par l'unité de contrôle. Le débit de la burette est commandé par une valve qui ne peut être qu'ouverte ou fermée ; l'apport du réactif et donc le titrage sont discontinus. La variation de différence de potentiel correspondant aux incréments successifs est compensée au moyen d'un potentiomètre asservi au déroulement du papier ; les apports successifs de titrant sont inscrits perpendiculairement à la direction du déroulement du papier, celui-ci étant alors immobile. Le titrant est ajouté par grandes quantités quand le pouvoir tampon est grand et inversement quand le pouvoir tampon est faible.

Le vase de titration utilisé (Radiometer VS 11) a un volume total de 200 ml ; il est muni de son agitateur. On a utilisé une électrode au calomel (KCl à saturation) comme électrode de référence et une électrode à plaque de platine poli (8 × 8 mm) comme électrode indicatrice. Le titrage est toujours précédé par un barbotage d'azote dont la durée varie selon la nature des corps dosés. Les deux électrodes, l'extrémité de la seringue et l'agitateur sont placés de façon que le mélange des réactifs ne se fasse pas au contact de l'électrode indicatrice. Le titrage est effectué sous faible débit d'azote (0,2 l/mm) ; il n'y a pas de phénomène de cavitation au niveau de l'électrode indicatrice.

On n'a pas cherché à réaliser des mesures de potentiel d'une précision supérieure à $\pm$ 6 mV. Une précision plus grande nécessite en effet des corrections de température importantes surtout avec l'électrode au calomel à saturation de KCl. On a donc adopté des normes de précision compatibles entre elles (HEWITT, 1950) :

pH à 0,1 unité près ;
température à 5°C près ;
potentiel à 6 mV près.

La valeur des potentiels standards des électrodes de référence (calomel, quinhydrone) ainsi que leurs coefficients de température et de pH sont empruntés à CONWAY (1952).

Les dosages ont été effectués sur des solutions aqueuses de polyphénols (10^{-2} M) et sur du cidre ou du vin après dilution au centième. Les tampons de dilution sont les suivants :

phosphate disodique 0,1 M, acide citrique 0,2 M ;
phosphate monopotassique phosphate disodique 0,05 M ;
phtalate acide de potassium 0,05 M ;
borax 0,01 M.

Les prises d'essai étant de quelques millilitres et le permanganate étant 0,1 N on a utilisé une burette de 2,5 ml. Les solutions de polyphénol doivent être fraîchement préparées et protégées de la lumière. Les produits polyphénoliques du commerce sont le plus souvent impurs.

Avant chaque titrage l'électrode indicatrice a été plongée juste avant usage dans une solution de Na_4SO_4 0,5 p. 100 dans l'eau puis mise à équilibrer dans une solution saturée de quinhydrone. On a contrôlé le bon fonctionnement statique de l'appareil en vérifiant que le potentiel indiqué pour des solutions saturées en quinhydrone est bien fonction linéaire de leur pH. Le bon fonctionnement dynamique du titreur a été vérifié selon le même principe lors du titrage de l'orthodiphénol et par polarographie (voir résultats).

Tous les dosages n'ont été entrepris que dans la mesure où l'indication d'électrode, fournie par le titreur, était correcte ; par exemple : 215 mV à pH 4,0 et 25°C. En cours de titrage le bon fonctionnement de l'appareil est indiqué par la régularité des apports successifs et la reproductibilité des courbes enregistrées.

RÉSULTATS

La figure 1 A présente un enregistrement fourni par l'appareil ; les segments ont des longueurs respectivement proportionnelles aux incréments de réactif ajouté et à la variation corrélative du potentiel. La courbe de titrage (B), (fig. 1) est identifiée au lieu des milieux de ces segments, elle est exprimée en fonction du pourcentage de forme oxydée. La courbe (C), (fig. 1), transformée de (B) par changement de variable, sert à caractériser le système étudié.

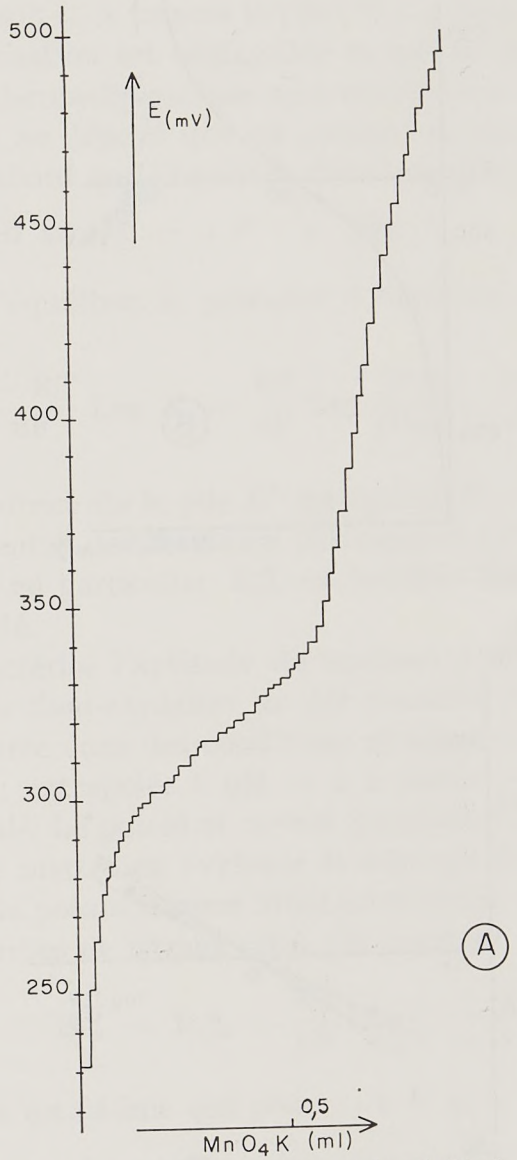


FIG. 1. A — *Titrage de l'*ortho-*diphénol*
A : Enregistrement du titreur : 10 mV/cm

Si l'enregistrement des courbes de titrage n'est pas indispensable pour effectuer un titrage il est nécessaire pour caractériser le système oxydoréducteur dosé. Pour cela il suffit de comparer les courbes prévues par la théorie avec les enregistrements obtenus : tout écart entre ces deux représentations signifiant que l'hypothèse faite ne correspond pas au processus d'oxydoréduction analysé.

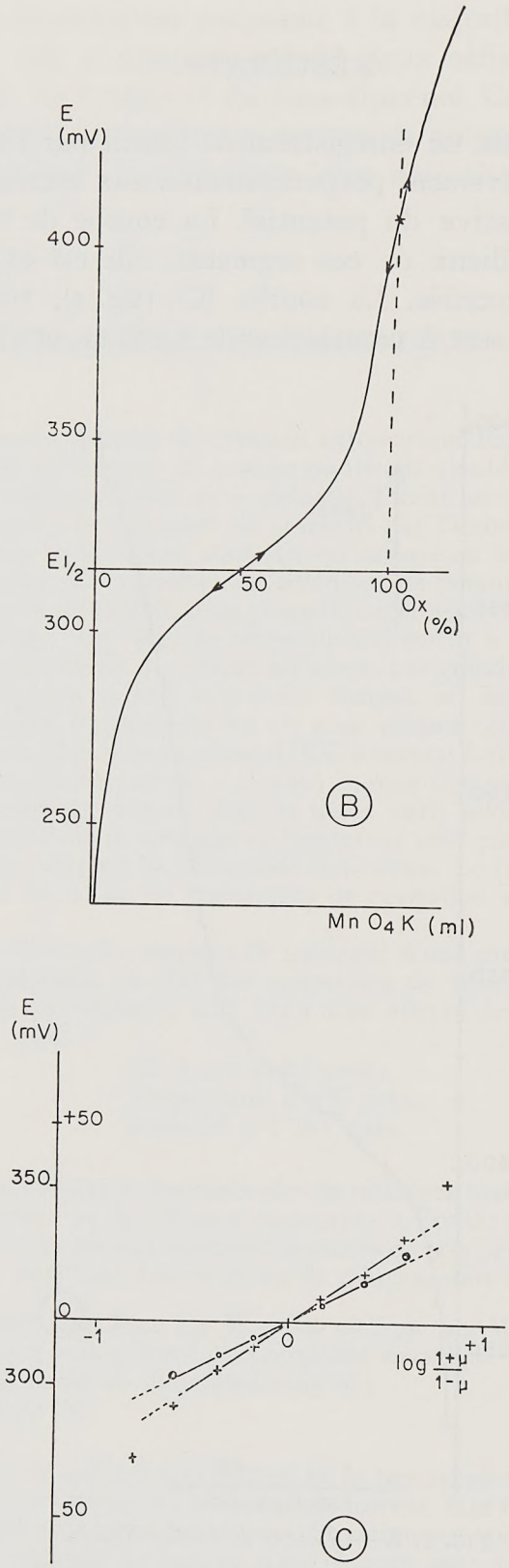


FIG. 1. B et C — *Titrage de l'*ortho-*diphénol*

B : Courbe de titrage, $E = f$ (p. 100 forme oxydée)
C : Transformée de la courbe de titrage, $E = f(\mu)$

Conditions de titrage : figure C.

Ortho-diphénol 2,5 et $5 \cdot 10^{-4}$ M en 100 cm³ du tampon phtalate.
Permanganate : 3 g/l
Durée de dosage = inférieure à 10 minutes

Il est nécessaire de rappeler ici quelques résultats concernant l'expression analytique des courbes de titrage.

1. *Expression analytique des courbes de titrage*

Les systèmes diphénol-quinone sont électroactifs, ils échangent des électrons avec les électrodes de métal inerte, il en résulte un état caractérisé par le potentiel d'équilibre de l'électrode indicatrice E_I. Ce potentiel est mesuré par rapport à celui d'une électrode de référence E_R ; pour cela, on constitue une pile dont on mesure la force électromotrice par une méthode de zéro. Certe mesure comporte le passage d'un courant, si faible soit-il, à travers la pile ; il y a donc polarisation [1] de l'électrode. Lorsque la polarisation est négligeable et que la mesure est faite dans des conditions d'équilibre thermodynamique avec un système chimiquement réversible le potentiel d'électrode ne dépend que du système oxydoréducteur étudié.

Supposons tout d'abord que l'équilibre chimique du système soit du type (A) :

$$\text{Red} \rightleftarrows \text{Ox} + n\,e^{(-)} + \text{pH}^{(+)}.$$

Soit K la constante d'équilibre, le potentiel d'électrode calculé est donné par la relation (1) :

$$E_I = \frac{-RT}{nF}\,\text{Log}\,K + \frac{RT}{nF}\,\text{Log}\,\frac{(\text{Ox})}{(\text{Red})} - \frac{p}{n}\cdot\frac{RT}{F}\cdot\text{pH} \qquad (1)$$

La force électromotrice de la pile E^R est égale à $E_I - E_R$; cette force électromotrice mesure le potentiel de l'électrode par rapport à l'électrode de référence R. Quand (Ox) = (Red), en particulier, $E^R_{1/2}$ est fonction linéaire du pH, et caractéristique du système oxydé.

Cette valeur caractérise l'aptitude du système à échanger des électrons elle est appelée *potentiel de demi-oxydation au pH considéré par rapport à l'électrode de référence choisie* ; mesurée dans des conditions standard à pH = 0 elle est désignée par *potentiel standard* ; extrapolée à pH = 0 à partir de pH voisins elle est dite *potentiel standard calculé*. Le potentiel *normal* (physiologique) est exprimé à pH 7,0.

Il est possible de mettre en évidence le rôle symétrique des formes oxydées et réduites dans ER. En posant comme MICHAELIS (1940) (Ox) = 1 + μ on obtient pour équation des courbes de titrage (2) à pH constant :

$$E^R_{pH} = E^R_{1/2} + \frac{RT}{nF}\,\text{Log}\,\frac{1+\mu}{1-\mu} \qquad (2)$$

La fonction E^R_{pH} n'est définie que pour $-1 < \mu < +1$, elle est symétrique par rapport à $\mu = 0$, elle admet en ce point une tangente d'inflexion de pente $\frac{2\,RT}{nF}$. Nous voyons sur la courbe C de la figure 1 que cette fonction ne représente correctement le phénomène de titrage que pour des valeurs de μ comprises entre $-0{,}7$ et $+0{,}7$.

[1] La polarisation de l'électrode résulte du passage du courant de mesure ; il y a électrolyse à la surface de l'électrode. Cette hétérogénéité engendre une force contre-électromotrice qui gêne d'autant plus la mesure que le potentiel d'équilibre est plus lentement atteint.

Ce phénomène est général ; on constate, sur les figures 3 et 6, que E_{pH}^{R} ne tend pas vers l'infini lorsque μ est voisin de 1 c'est-à-dire lorsque (Ox) ou (Red) sont très faibles. Les courbes de titrage présentent des points d'inflexion dont la pente varie selon les concentrations (fig. 1 C) ou la nature des tampons (fig. 3). Il n'est pas surprenant de constater que E_{pH}^{R} n'est pas représenté correctement par (2) quand l'une des formes oxydée ou réduite est présente à concentration suffisamment faible : cet effet est analogue, vraisemblablement, à l'établissement des « potentiels limites » décrits par BÉZIER (1943) et CHARLOT (1943). Ces auteurs ont montré que si l'un des éléments du couple oxydoréducteur est présent à très faible concentration il ne participe pas à l'établissement du potentiel d'électrode. Le potentiel indiqué alors, dépend entre autre de la composition (fig. 3) et de la concentration des espèces en solution. Comme il est possible que d'autres facteurs interviennent dans l'établissement de ces potentiels (voir Discussion) on les désigne dans la suite par *potentiel apparent*.

Un troisième rappel doit être fait ici. On remarque sur les figures (1 C) et (7) que les tangentes d'inflexion correspondant à $\mu = 0{,}5$ n'ont pas la pente constante déduite de (2). Cette variation est délicate à expliquer parce qu'elle conduit à expliciter l'expression (A) choisie pour représenter la réaction de titrage. Il faut pour cela tenir compte des étapes intermédiaires, on ne dispose pas actuellement de résultats et de théories suffisamment détaillés (SUTIN, 1966). Il semble cependant que l'instabilité caractéristique des quinones en solution permette d'interpréter qualitativement la variation de pente en fonction de la concentration. Il est possible, de plus, que les différences observées entre dérivés de l'*o*-diphénol soient dues à l'existence de formes intermédiaires (S_q) de type semiquinone.

Si l'on suppose que l'équilibre (A) résulte des deux étapes univalentes :

$$\text{Red} \rightleftarrows S_q + e^{(-)}$$
$$\text{puis } S_q \rightleftarrows \text{Ox} + e^{(-)}$$

et que l'ensemble donne lieu à l'équilibre global (B)

$$\text{Red} + \text{Ox} \rightleftarrows 2\ \text{Sq}$$

on constate, voir Annexe que l'équation au potentiel d'électrode conserve sa symétrie par rapport à $\mu = 0$; l'existence de la forme semi-quinonique intermédiaire se traduit par l'introduction d'un terme additif, fonction logarithmique de la constante k de l'équilibre (B). Lorsque $k = 4$ ce terme s'annule, l'équation au potentiel est identique à (2). Lorsque k augmente, la pente de la tangente d'inflexion augmente ; puis à partir d'une certaine valeur limite ($k = 16$) la courbe de titrage présente deux points d'*inflexion latéraux* supplémentaires (MICHAELIS, 1940). *La variation de potentiel* dans la partie linéaire de la courbe entre 0 et 0,5 est appelée *indice potentiométrique* (E_i) ; l'existence de la semiquinone n'est révélée par des points d'inflexion latéraux que si $E_i > 40$ mV.

2. *Caractérisation de l'o-diphénol et de ses dérivés.*

La figure 1 C permet de constater que la relation existant entre E_i et μ est bien du type (2). Le potentiel standard mesuré dans ces conditions (pH = 4, 25°C, tampon phtalate) vaut 315 mV

A — *Effets du pH et de la nature du tampon.*

On constate sur la figure 2 que la variation de $E^R_{1/2}$ en fonction du pH est linéaire et que les droites représentatives ont des pentes légèrement différentes suivant le tampon, mais voisines de 50 mV/unité pH. Le potentiel standard (extrapolé à pH = 0) du système *ortho*-diphénol vaut respectivement 515 mV dans le tampon phosphate citrate et 545 mV dans les tampons phtalate et phosphate ; ces derniers se distinguent cependant, par la valeur de la pente des droites représentatives qui valent respectivement 58 et 50 mV/unité pH à 25°C.

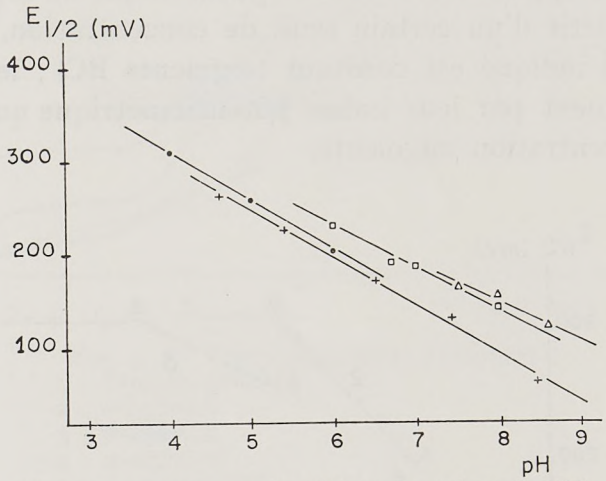


FIG. 2. — *Influence du pH sur la valeur de* $E^{1/2}$
o-diphénol : $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ M en 100 ml de tampon :
—+—+— : Phosphate/citrate
— · — · — : Phtalate/soude
—□—□— : Phosphates
—△—△— : Borate/acide borique

On constate aussi que pour un même pH (fig. 2) mais dans des tampons différents les valeurs de $E^R_{1/2}$ trouvées sont différentes. Cet effet est précisé par la figure 3.

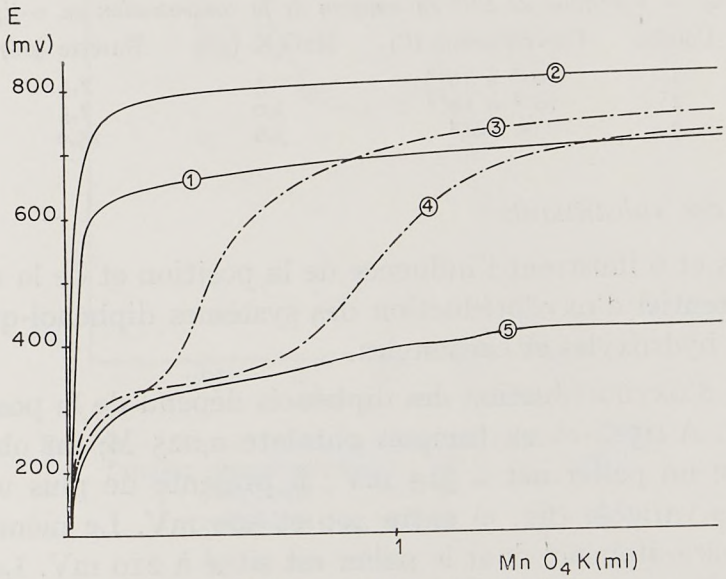


FIG. 3. — *Influence de la nature du tampon*
1. Tampon phosphate/citrate seul
2. Tampon phtalate
3. *o*-diphénol $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ M : Tampon phtalate
4. *o*-diphénol $5 \cdot 10^{-4}$ M : Tampon phtalate
5. *o*-diphénol $5 \cdot 10^{-4}$ M : Tampon phosphate citrate

L'influence de la nature du tampon est particulièrement sensible dans les zones où le potentiel indiqué est un potentiel apparent par exemple un point d'équivalence (fig. 3 et 7).

B — *Effets de la concentration en* ortho-*diphénol.*

Les courbes de la figure 4 permettent de constater que le potentiel de demi-oxydation n'est constant et indépendant de la concentration en *o*-diphénol que dans certaines conditions de dosage. L'électrode de platine indique pour les faibles concentrations un « potentiel apparent » fonction logarithmique de la concentration initiale (segments AB). A partir d'un certain seuil de concentration, dans des conditions données, le potentiel indiqué est constant (segments BC) ; les courbes de titrage se distinguent seulement par leur indice potentiométrique qui diminue (fig. 1 C et fig. 3) quand la concentration augmente.

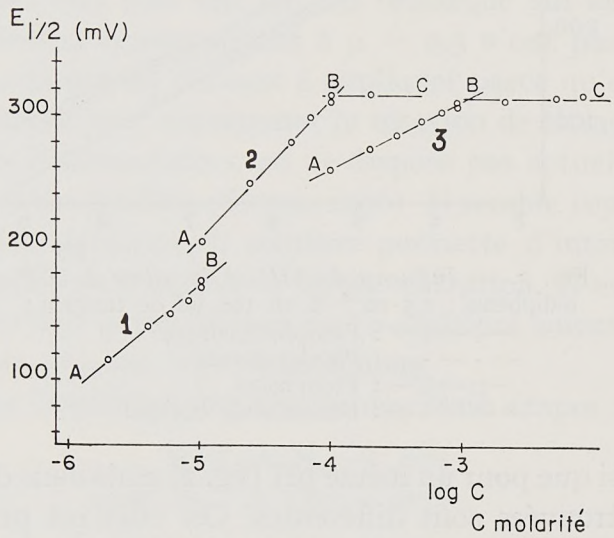


FIG. 4. — *Variation de $E^{1/2}$ en fonction de la concentration en* o-*diphénol*

Courbe	Concentration (C)	MnO_4K (g/l)	Burette (ml)
1	10^{-6} à 10^{-5}	0,3	2,5
2	10^{-5} à 10^{-3}	3,0	2,5
3	$< 10^{-4}$	3,0	25,0

C. — *Influence des substituants*

Les figures 5 et 6 illustrent l'influence de la position et de la nature des substituants sur le potentiel d'oxydoréduction des systèmes diphénol-quinone substitués correspondants : hydroxyles et carbonyles

Le potentiel d'oxydoréduction des diphénols dépend de la position relative des deux hydroxyles. A 25°C et en tampon phtalate 0,025 M, on observe que l'*ortho*-diphénol présente un palier net à 315 mV ; il présente de plus une inflexion sensible (fig. 5) mais variable (fig. 3) entre 400 et 500 mV. Le même phénomène est observé avec le *para*-diphénol dont le palier est situé à 210 mV. La différence entre des potentiels de demi-oxydation de l'*ortho*- et du *para*-diphénol a été confirmée par polarographie (fig. 6). La comparaison a été faite au moyen d'un polarographe à 3 électrodes ; elle reproduit l'expérience de MULLER et BAUMBERGER (1940) sur le *para*-diphénol. Les potentiels de demi-vague sont respectivement pour l'*ortho*- et le

para-diphénol de + 80 mV et de — 15 mV à pH = 7,0 en tampon phosphate/citrate et à 25°C et par rapport à une électrode au calomel saturée en KCl. L'influence du tampon sur le potentiel standard est éliminé en première approximation par différence.

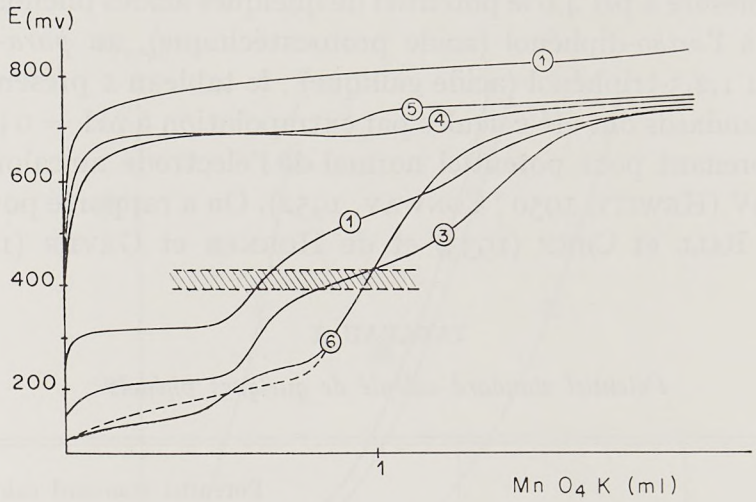


FIG. 5. — *Titrage de certains polyphénols*
1 : Tampon phtalate
2 : *o*-diphénol
3 : *p*-diphénol
4 : *m*-diphénol
5 : 1,3,5-triphénol
6 : —— 1,2,3-triphénol
6 : – – – 1,2,3-triphénol et *p*-diphénol
Hachures : zone de virage du Carmin d'indigo

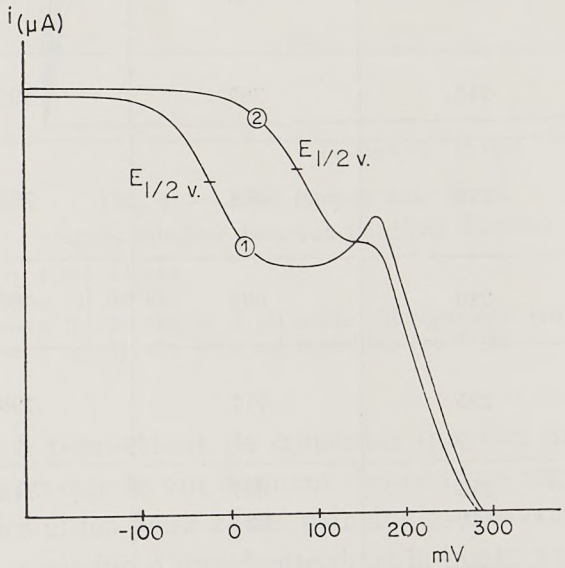


FIG. 6. — *Caractérisation polarographique des diphénols*
Tampon phosphate/citrate ; pH = 7,0 ; 25°C
1 : *p*-diphénol : $2 \cdot 10^{-3}$ M
2 : *o*-diphénol : $2 \cdot 10^{-3}$ M

La figure 5 permet, aussi, de comparer deux triphénols. Le phloroglucinol 1, 3, 5-triphénol se comporte comme le *méta*-diphénol dont le palier est situé aux environs de 700 mV soit nettement au-dessus de la zone de virage du carmin d'indigo. Au contraire la courbe de titrage du pyrogallol (1,2,3-triphénol) présente invariablement

deux paliers nets situés à 110 mV et 220 mV ; la mise en évidence du second palier n'est possible qu'après élimination poussée de l'oxygène (barbotage d'azote R repurifiée pendant 60 minutes). On a constaté de plus que le mélange équivalent de *p*-diphénol et de pyrogallol présente seulement un palier, moyenne de l'ensemble (fig. 5).

On a enfin mesuré à pH 4,0 le potentiel de quelques acides phénols correspondant respectivement à l'*ortho*-diphénol (acide protocatéchique), au *para*-diphénol (acide gentisique) et au 1,2,3-triphénol (acide gallique) ; le tableau I présente ces résultats. Les potentiels standards ont été calculés par extrapolation à pH = 0 (RT/F = 59 mV pH à 25°) et en prenant pour potentiel normal de l'électrode au calomel à saturation en KCl = 246 mV (HEWITT, 1950 ; CONWAY, 1952). On a rapporté pour comparaison, les résultats de BALL et CHEN (1933) et de HORNER et GEYER (1965 *b*).

TABLEAU I

Potentiel standard calculé de quelques phénols

Nom courant (désignation chimique)	$E_{1/2,4}^{c}$ (phtalate)	Potentiel standard calculé		
		déduit de $E_{1/}^{c}$ extrapolé de pH 4,0	d'après BALL et CHEN (1933) extrapolé de pH 1,3	d'après HORNER et GEYER (1965 *b*) extrapolé de pH 6,7
acide protocatéchique (1-carboxy-3,4-dioxy-benzène)	360	842	883	833
orthodiphénol (1,2-dioxybenzène)	315	797	792	795
acide gentisique (1-carboxy-2,4-dioxy-benzène)	270	752	793	—
paradiphénol (1,4-dioxybenzène)	210	692	696	700
acide gallique (1-carboxy-3,4,5-trioxy-benzène)	235	717	799	708 (*)
pyrogallol (1,2,3-trioxybenzène)	215 110	697 592	713	680

(*) Calculé d'après HORNER et GEYER, 1965 *b*, p. 2036.

3. *Caractérisation des mélanges de polyphénols ; boissons*

On a constaté figure 5 que les mélanges de polyphénols peuvent être dosés. Lorsque leurs potentiels standards sont voisins, la courbe résultante représente la résultante des courbes de titrage des éléments du mélange. Il semble qu'il en soit

de même avec les mélanges de polyphénols présents dans les boissons. La figure 7 illustre ce fait, l'addition à un jus de pomme d'acide chlorogénique et de catéchine fait apparaître un palier semblable à celui produit par une simple augmentation du volume de la prise d'essai.

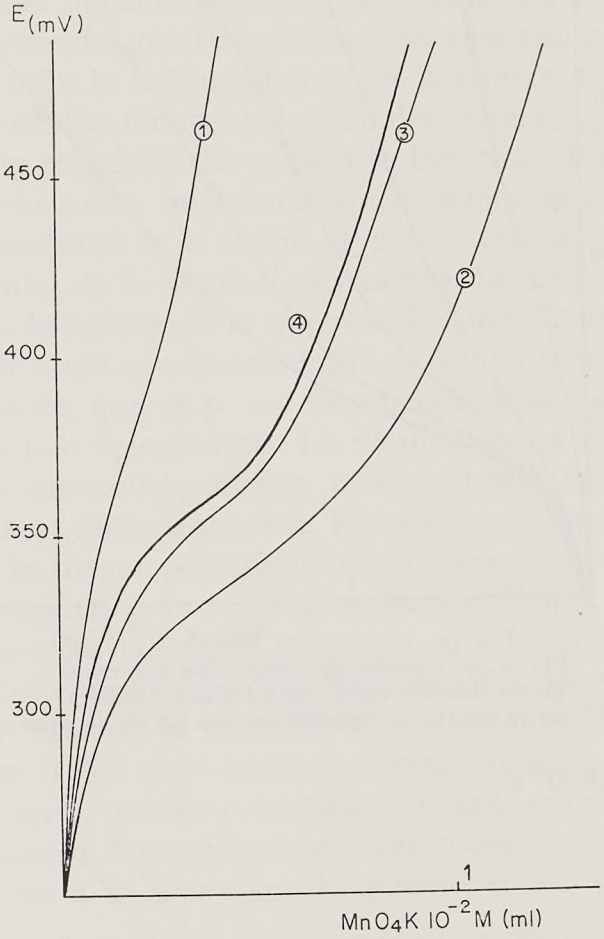


FIG. 7. — *Effet tampon dans le vin*
(après dilution dans 100 ml d'eau distillée)

1 = 1 ml de vin
2 = 4 ml de vin
4 = 2 ml de vin + 2 ml acide chlorogénique (10^{-2} M)
3 = 2 ml de vin + 2 ml catéchine (10^{-2} M)

Les figures 7 et 8 permettent de constater que des mélanges aussi complexes que le jus de pomme ou que le vin donnent des courbes régulières et reproductibles. On distingue sur celles-ci les deux zones principales des courbes de titrage : la zone du « pouvoir tampon » voisine d'une droite dont la pente varie avec la concentration et la zone de « fin de titrage » qui correspond à des « potentiels apparents » de l'électrode indicatrice. Cette zone est parfois difficile à déterminer, cela gêne le titrage ; la composition du milieu comme celle des tampons (fig. 3) influe sur la netteté du virage. La détermination des points d'inflexion est possible par simple tracé à la règle ou bien par détermination graphique ou enfin par calcul (YAN, 1965). Le dosage direct des polyphénols est donc possible ; on constate, sur la figure 9, que le choix de la méthode de détermination du point d'équivalence introduit des différences systématiques d'appréciation.

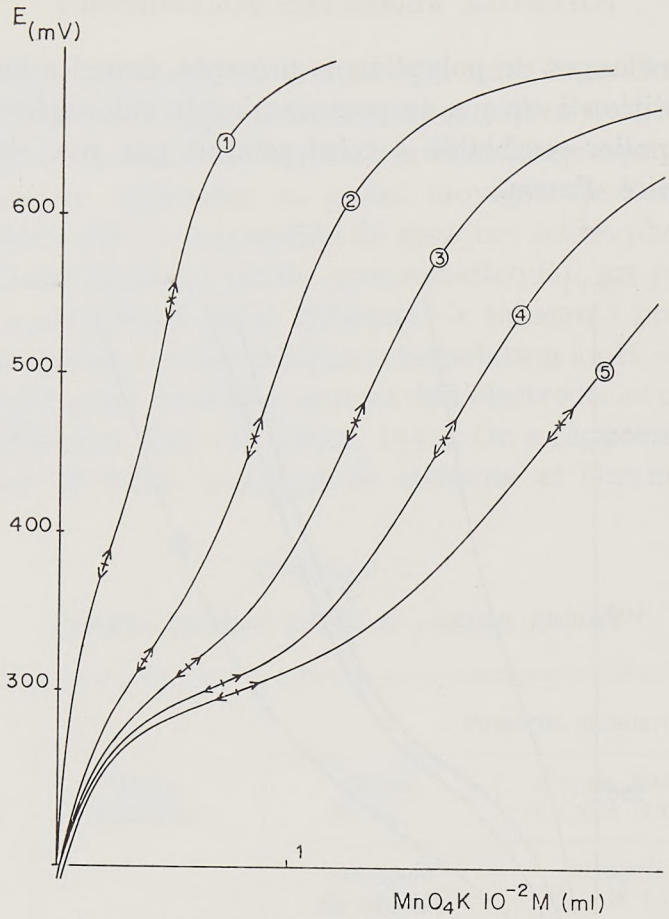


FIG. 8. — *Courbes de titrage d'un vin rouge*
(après dilution dans 100 ml d'eau distillée)
Le numéro porté sur la courbe correspond au volume de la prise d'essai en ml

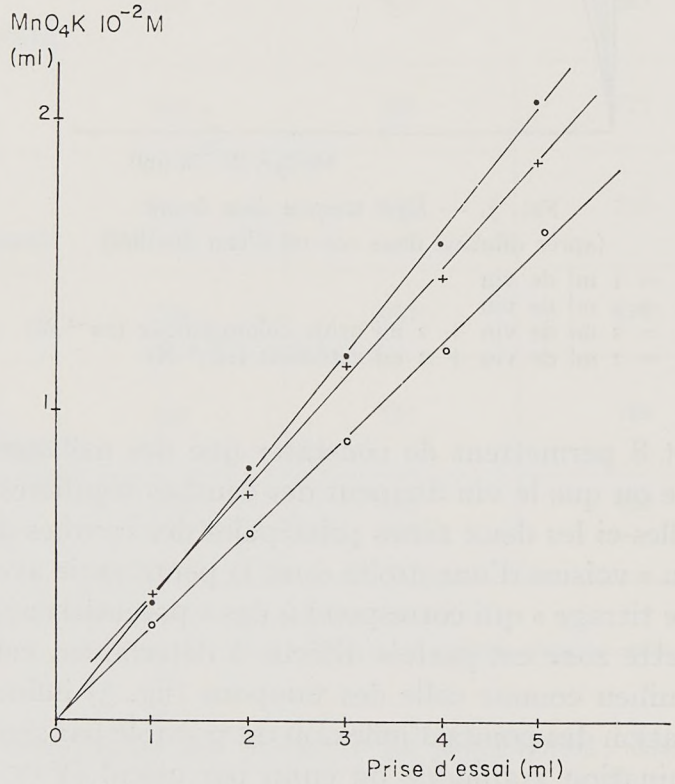


FIG. 9. — *Titrage du jus de pomme et du vin*
(après dilution dans 100 ml d'eau distillée)
++ jus de pomme
● ● vin (point d'inflexion empirique)
○ ○ vin (point d'inflexion calculé)

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La discussion des principaux résultats peut être abordée en trois points concernant respectivement la difficulté générale de mesure des potentiels des systèmes quinoniques ; l'existence des réactions successives conduisant à des produits intermédiaires définis et enfin la valeur relative des potentiels standards.

La mesure du potentiel d'oxydoréduction des systèmes quinoniques est rendue difficile par la grande réactivité des quinones. Dès 1930, FIESER a montré que le potentiel de ces solutions est « sujet à une dérive définie au cours du temps ». Cette dérive est due à l'instabilité de la forme oxydée du couple, elle se traduit par une diminution du potentiel de la solution en fonction du temps. La vitesse de dérive dépend du pH et de la nature de la quinone. D'après KURSANOV et ZAPROMETOV (1952), il ne resterait après 9 minutes, à pH = 4,0 en tampon acétate 0,02 M et sous atmosphère d'azote, que 75 p. 100 de *o*-benzoquinone et 25 p. 100 seulement de l'*o*-quinone de la (—) épicatéchine. La diminution du potentiel entre l'apport de deux incréments successifs peut-être telle qu'il faut en tenir compte surtout lorsque les mesures sont faites lentement. FIESER (1930) a pour cette raison mis au point une méthode de titrage potentiométrique discontinue qui permet de corriger la « dérive » par extrapolation au temps zéro. BALL et TCHEN (1933) ont utilisé cette méthode pour mesurer les potentiels rapportés au tableau 1. Vers 1940 la polarographie a été introduite avec succès par MULLER (MULLER et BAUMBERGER, 1940 ; MULLER, 1942) pour mesurer le potentiel de ces systèmes instables ; ces résultats, discutés par PEOVER (1962) et HORNER et GEYER (1965 *a*), sont confirmés ici. On constate sur le tableau 1, que les potentiels standards calculés d'après les trois méthodes sont en bon accord. L'oxydation permanganique, dans les conditions précisées figure 1, conduit donc à la formation de quinone et à des équilibres du type :

$$\text{quinone} + 2\,e^{(-)} + 2\,H^{(+)} \rightleftarrows \text{diphénol.}$$

Cette comparaison permet l'identification du palier de la courbe de titrage correspondant à l'effet tampon du système ; sa position dans l'échelle de potentiel est ainsi confirmée. Les potentiels mesurés à chaque instant sont des « potentiels d'équilibre virtuel » du fait de la « dérive » due aux quinones, ils sont analogues à ceux décrits en polarographie par PEOVER (1962), HORNER et GEYER (1965 *a*).

Le second point de la discussion concerne l'existence de réactions successives et donc la possibilité de réaliser une oxydation partielle des polyphénols. L'existence d'étapes successives d'oxydation se traduit par l'apparition de paliers sur la courbe de titrage. Cette condition est suffisante mais non pas nécessaire ; cette remarque est tout autant valable pour les réactions successives aboutissant à l'oxydation complète que pour chacune de ces réactions intermédiaires, c'est le cas des semiquinones (Annexe). L'existence de paliers séparés par des points d' « équivalence » correspondant à une augmentation brutale de potentiel dépend du choix des conditions de dosage (pH ; nature du tampon) qui déterminent la spécificité de l'action du réactif. Ce choix détermine donc à la fois la « force oxydante » (*potentiel*) du permanganate ainsi que la « vitesse relative » des réactions qui peuvent avoir lieu (*énergie d'activation*) pour un certain niveau du potentiel du mélange réactionnel. Ainsi la technique poten-

tiométrique permet de mettre en évidence l'existence des réactions successives pendant l'oxydation permanganique des polyphénols ; la première d'entre elles (tabl. 1) correspond à la formation de quinone, les autres restent à identifier. Par exemple, dans le cas des *méta*-diphénols il est vraisemblable que le palier voisin de 650 mV (fig. 5) correspond à une réaction globale d'ouverture du cycle puisqu'il n'existe pas de *méta*-quinone stable (FINAR, 1964). De même, il est vraisemblable que la limite supérieure des potentiels imposés par l'oxydation du tampon phtalate correspond au même type de réaction, commune d'ailleurs aux dérivés alkylés du benzène (SALMON-LEGAGNEUR, 1946). Il n'est pas possible cependant, par la seule méthode potentiométrique d'identifier le système responsable de l'inflexion d'importance variable sur les courbes de l'*ortho*- et du *para*-diphénol vers 400-500 mV (fig. 5). La variabilité de la forme de la courbe traduit vraisemblablement l'établissement d'un potentiel apparent dû à une réaction lente (ou irréversible) [1], conséquence possible d'un « couplage oxydatif » (MONTIES, 1966 *b*). Ce modèle de réactions expliquerait du même coup la consommation de deux atomes d'oxygène par molécule d'*ortho*-diphénol aussi bien lors des oxydations enzymatiques (DAWSON et TARPLEY, 1951) que lors de l'oxydation permanganique (WILLIAMS, 1952).

Le troisième et dernier point de la discussion concerne la valeur relative des potentiels standard mesurés. Le tableau 1 permet de vérifier que les substituants donneurs d'électrons, hydroxyle, abaissent le potentiel alors que les accepteurs, carboxyle, l'élèvent. Il est vraisemblable que les différences quantitatives observées avec les acides phénols (tabl. 1) sont dues au fait que les potentiels standards sont extrapolés à pH 0 sans tenir compte de l'état de dissociation correspondant au pH de mesure. On sait que l'ion carboxylate, stabilisé par résonance, a un effet accepteur inférieur à celui du carbonyle non dissocié ; il est donc normal de constater que les potentiels trouvés par BALL et CHEN (1933) soient les plus élevés. Le potentiel de l'acide gallique a été calculé (tabl. 1) en supposant que les effets de 3 —OH et du 4 —COOH sont additifs ; l'accord entre la valeur calculée et la mesure faite ici est surprenant : il est inattendu que les deux substituants d'un même cycle aromatique ait un simple effet additif. On a observé de même que l'acide caféique a un potentiel standard calculé de 790 mV : les résultats de HORNER et GEYER (1965*b*) sont donc confirmés ; le substituant —CH=CH—COOH élève donc aussi le potentiel du système substitué non conjugué correspondant — l'acide hydroxycaféique (750 mV) par effet additif. Ainsi, bien que le potentiel standard ne soit pas directement proportionnel à l'affinité électronique du couple (PEOVER, 1962) il semble, d'après l'ensemble de ces résultats, que le potentiel d'oxydoréduction reste un indice valable pour caractériser le pouvoir oxydoréducteur d'un système.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le titrage potentiométrique des polyphénols au moyen d'un titreur automatique par compensation rend possible la caractérisation rapide des systèmes oxydoréduc-

[1] La vitesse de réaction conditionne la possibilité de réaliser réversiblement une réaction. Un système dont la courbe de polarisation a une forte pente est dit « rapide » ; on peut dans ce cas effectuer une oxydation (ou une réduction) avec une vitesse finie dans des conditions voisines de la réversibilité (CHARLOT, 1966 : p. 143).

teurs polyphénoliques en solution simple. L'enregistrement des courbes de titrage permet non seulement de caractériser le type d'équilibre qui leur correspond mais encore de préciser l'influence des substituants sur le potentiel standard des systèmes homologues. Cette méthode paraît susceptible de permettre la caractérisation de polyphénols complexes, parfois extrêmement instable dans certaines solutions = acides hydroxycinnamiques, flavoïdes (flavanoïdes et flavonoïdes) ainsi que leurs dérivés. Utilisée directement ou par différence en présence de carmin d'indigo cette méthode peut être utilisée pour doser les mélanges de polyphénols contenus dans les boissons.

La signification du pouvoir tampon de tous ces systèmes mérite d'être analysée de façon approfondie. Complétée par la connaissance des effets de solvatation ou de couplage oxydatif avec les autres espèces en solution cette méthode pourrait permettre de mettre en évidence le rôle des facteurs d'oxydoréduction dans l'élaboration et la maturation des boissons.

Il semble, cependant, que cette méthode ne soit pas à elle seule suffisante pour permettre l'analyse de tous les phénomènes observés. L'utilisation complémentaire ou simultanée de techniques spectroscopiques permettrait de rendre cette analyse plus aisée et plus efficace.

Reçu pour publication en mai 1967.

ANNEXE

Influence de l'existence de semi-quinone intermédiaire sur l'expression analytique du potentiel d'électrode

On suppose que la réaction globale d'oxydation bivalente résulte de la succession de deux étapes univalentes. Trois niveaux d'oxydation interviennent donc : la forme réduite R ; la forme semi-quinone S, la forme oxydée O respectivement aux concentrations r, s, et o.

Le problème consiste à exprimer le potentiel d'électrode en fonction des quantités connues : la concentration totale du système (t), la quantité de réactif équivalente (x) et les constantes d'équilibre.

Deux relations sont évidentes entre les 3 inconnues :

$$r + s + o = t$$
$$s + 2\,o = x.$$

La troisième relation, permettant de résoudre le problème est fournie par une hypothèse sur le système :

1er *cas* : *Absence de perturbation secondaire* :
dimérisation des espèces réagissantes ou processus irréversible, par exemple.

On suppose (Michaelis, 1940, 1951) que :

$$R + O \rightleftarrows 2\,S \qquad \text{avec} \qquad s^2 = k \cdot r \cdot o.$$

k = constante d'équilibre de formation de la semiquinone.

On élimine r, s et o entre les équations au potentiel d'électrode correspondant aux deux réactions univalentes et à l'équilibre bivalent correspondant.

En posant

$$j = \frac{4 - k}{k}$$

On trouve comme expression du potentiel d'électrode la relation (3) :

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{2F} \operatorname{Log} \frac{1 + \mu}{1 - \mu} + \frac{RT}{2F} \operatorname{Log} \frac{\sqrt{1 + j(1 - \mu^2)} + \mu}{\sqrt{1 + j(1 - \mu^2)} - \mu} \qquad (3)$$

Les points d'inflexion de la courbe (3) correspondent aux valeurs de μ qui annulent $d^2 E/d\mu^2$; trois points d'inflexions sont possibles. L'un correspond à $\mu = 0$, il correspond à la valeur $E^R_{1/2}$; les deux autres points d'inflexion latéraux ont pour abscisse

$$\mu_i = \pm \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k - 16}{k - 4}}$$

Selon les valeurs de k la forme des courbes varie. On distingue aisément les cas suivants :

$o < k < 10^{-2}$: l'expression (3) est équivalente à celle qui correspond aux systèmes bivalents ; la courbe $E_{(\mu)}$ a un seul point d'inflexion et l'indice potentiométrique vaut 14,3 mV à 25°. La méthode potentiométrique ne permet donc pas la caractérisation de faibles quantités de semiquinone.

$k = 4$: on constate que $j = 0$ donc l'expression (3) est équivalente à celle qui correspond au système bivalent (A). La courbe $E_{(\mu)}$ a un seul point d'inflexion, son indice potentiométrique vaut alors 28,6 mV à 25°.

$k = 16$: les valeurs de μ_i sont réelles et comprises entre -1 et $+1$. La courbe $E_{(\mu)}$ présente 3 points d'inflexion ; son indice potentiométrique augmente rapidement. Dans le cas extrême ou $\mu_i = \pm 1/2$ la courbe de titrage présente deux paliers symétriques ; l'ensemble témoigne de l'existence de deux réactions univalentes indépendantes successives.

2e cas. Existence de perturbations secondaires : dimérisation de la semiquinone intermédiaire ou de la forme oxydée

Michaelis (1951) et Clark (1960) ont envisagé respectivement l'un des deux cas. Ils ont considéré tous deux le seul équilibre 2 monomère/1 dimère en phase homogène. L'équation au potentiel d'électrode fait intervenir à la fois les constantes apparentes d'équilibre et la concentration totale du système en solution. Dans les deux cas le potentiel de demi-oxydation n'est pas un potentiel standard, il dépend en effet de la concentration totale en solution.

SUMMARY

OXYDO-REDUCTION POTENTIAL OF POLYPHENOLS. POTENTIOMETRICAL DETERMINATION OF THE PHENOLIC COMPONENTS OF APPLE JUICE AND BEVERAGE

Phenolics are usually estimated by direct oxydation with potassium permanganate ; indigo carmine being used as indicator. The determination can be carried quickly and more objectively by potentiometric technique with an automatic recording titrator.

Catechol (*ortho*-diphenol) has been used as standard for testing the reaction. With monopotassic phtalate (0,025 M) as buffer the oxydation give rise, in a first step, to the correspondent quinone. The standard potential measured are in agreement with polarographic and discontinuous-potentiometric measurement. The position and electronic effect of some substituant (hydroxyl and carboxyle) are discussed.

Mixture of phenolics (wine, apple juice) give only apparent potentials. Potentiometric titration, howewer, allow the direct or indirect estimation of « total phenolics ».

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BALL E. G., CHEN T. T., 1933. D'après HEWITT L. F., 1950. *Oxydation reduction potentials in bacteriology and biochemistry*, p. 71, 72. Levingstone éditeur (Edinburg).

BAZIER D., 1943. Étude électrochimique de la précipitation de l'hydroxyde ferrique. *Bull. Soc. chim.*, **10**, 329-334.

CHARLOT G., 1943. Vitesse des réactions d'oxydoréduction. *Bull. Soc. chim.*, **10**, 339-343.

CHARLOT G., 1966. *Les méthodes de la chimie analytique*, 1022 p. Masson Paris.

CONWAY B. E., 1952. In RAUEN H. M., 1950. *Biochemische Taschenbuch*, p. 662. Springer Verlag. Berlin.

DAWSON C. R., TARPLEY W. B., 1952. In SUMMER J. B., MYRBACK K., p. 462, Vol. **2**,(1).*The Enzymes*, Acad. Press, New York.

FIESER L. F., 1930. The potential of some instable oxydation-reduction. systems. *J. amer. Soc.*, **52**, 915, 926.

FINAR I. L., 1963. *Organic chemistry* t 1., 668 p. Longmanns Green éditeur (4e édition).

HEWITT L. F., 1950. *Oxydation reduction potentials in bacteriology and biochemistry*, 215 p. Levingstone Ltd. Edition, 6e ed.

HORNER L., GEYER E., 1965 *a*. Die polarographische Bestimmung der Redoxpotentiale von Brenzcatechin Derivaten. *Chem. Ber.*, **98**, 2009-2015.

HORNER L., GEYER E., 1965 *b*. Redox potentiale von Brenzcatechin Derivaten. *Chem. Ber.*, **98**, 2016-2045.

KING F. E., BOTTOMLEY W., 1945. The chemistry of extractives from hardwoods. *J. chem. Soc.*, 1399-1403.

KURSANOV M. H., ZAPROMATOV M. H., 1952. In ZAPROMETOV, 1964. Biochimie des catéchines (titre traduit) p. 187. *Acad. Sci. U. R. S. S.* Institut Timiriasef 465 p.

LAUDE G., 1940. Phenols in GRIGNARD V. *Traité de Chimie organique* 652-1140. **6**.

MICHAELIS L., 1940. Occurence and signification of semiquinone radicals. *J. amer. Chem. Soc.*, **40**, 39-75.

MICHAELIS L., 1951. *Théory of oxydation reduction*, in SUMMER J. B., MYRBACK K. **2** (1), 1-46, Acad Press, New York.

MONTIES B., 1966 *a*. Nature et propriétés chimiques des principaux polyphénols de la pomme. *Ann. Physiol. vég.*, **8**, 49-75.

MONTIES B., 1966 *b*. Nature et propriétés chimiques des principaux polyphénols de la pomme : propriétés chimiques des polyphénols application à la technologie du jus de pomme. *Ann. Physiol. vég.*, **8**, 101-135.

MULLER O. H., BAUMBERGER J. P., 1940. D'après KOLTHOFF I. M., LINGANE J. *J. Polarography*, p. 261. Interscience éditeur 1952.

MULLER O. H., 1942. Oxydation-reduction potentials mesured with the dropping electrode. *J. biol. Chem.*, **145**, 425-441.

MUNTZ M. A., 1888. In FREMY M. *Encyclopédie chimique*, **4**, p. 475. Dunod éditeur Paris.

NÈGRE E., 1945. *Contribution à l'étude des matières tannoïdes du vin.* Thèse de Doctorat ès Sciences, Montpellier.

PEOVER M. E., 1962. A polarographic investigation into the redox behaviour of quinones : the roles of électron affinitie and solvent. *J. chem. Soc.*, 4540-4549.

RIBÉREAU-GAYON J., GARDRAT J., 1957. Application du titrage potentiométrique à l'étude du vin. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 185-216.

ROBERTS E.A.H., BARUA D. N., 1940. Methods for the volumetric estimation of tea tannins : a new alkaline permanganate method. *Biochem. J.*, **34**, 1524-1531.

ROBERTS E. A. H., 1962. In GEISSMAN T. A., *The chemistry of flavonoïd compounds* 468-512. Pergamon Press. New York.

SUTIN N., 1966. The Kinetics of inorganic reactions in solution. *Ann. Rep. Phys. Chem.*, **17**, 119-165.

VENKATARAMAN K., 1962. In GEISSMAN T. A., 1962. *The chemistry of flavonoïd compounds*, 70-106. Pergamon Press. New York.

WILLIAMS A. H., 1952. The tannin of apple juice and cider : an interpretation of the permanganate titration methode. *An. Rep. Agric. Hortic. Stn Long Ashton.* 219-224.

YAN J. F., 1965. A method for the determination of equivalence point in potentiometric titration in utilizing inequal volume increments. *Anal. Chem.*, **37**, 1588-1590.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (3), 269-277.

DIFFICULTÉS D'INTERPRÉTATION DE L'INDICE DES SUBSTANCES AROMATIQUES VOLATILES DU JUS DE CASSIS — VARIATIONS DE CET INDICE, DE LA TENEUR EN MÉTHANOL, DE L'ACIDITÉ ET DES GLUCIDES SOLUBLES, AU COURS DE LA FABRICATION

H. BOUSCHARAIN et J. BERGERET
avec la collaboration technique de R. BOIVIN

Laboratoire des Subsistances, 21 - Dijon
Laboratoire des Fermentations, I. B. A. N. A., 21 - Dijon

SOMMAIRE

Les auteurs se sont attachés à évaluer l'indice des substances aromatiques volatiles au cours des différents stades de la fabrication du jus de cassis-matière première, en adoptant la technique décrite par L. DEIBNER. Cet indice représente globalement l'arôme du fruit ou du produit analysé.

Simultanément l'alcool méthylique libéré par la dépectinisation enzymatique a été dosé.

Cette étude rend nécessaire l'exposé du mode d'élaboration du jus de cassis-matière première, de manière à mettre en évidence les retentissements éventuels de la technologie sur la qualité du produit fini.

L'acidité de titration et la teneur en glucides totaux ont été calculées.

I. — TECHNOLOGIE DU JUS DE CASSIS

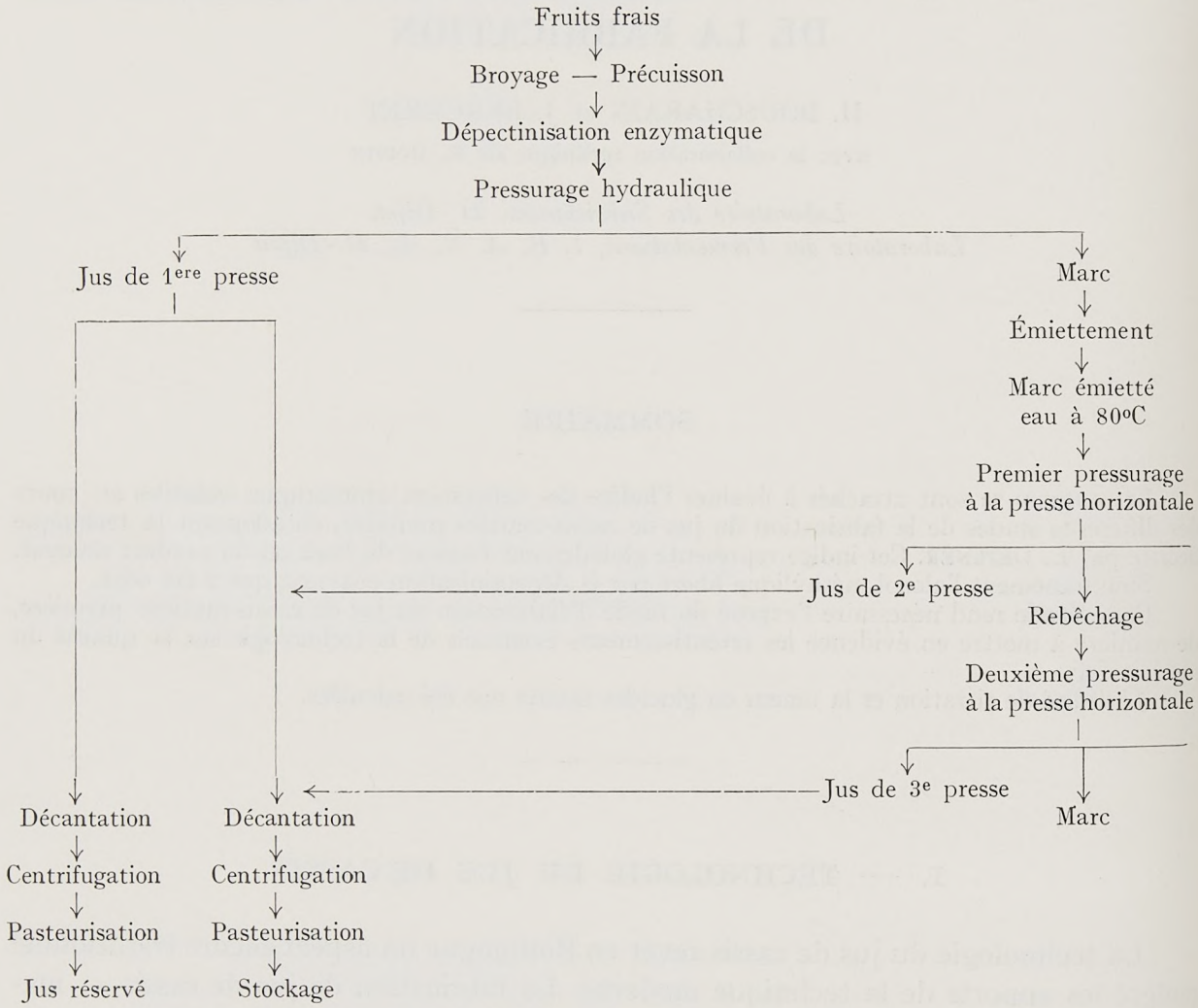
La technologie du jus de cassis revêt en Bourgogne un aspect encore traditionnel malgré les apports de la technique moderne. La fabrication de jus de cassis — matière première — obéit d'autre part à un impératif saisonnier qui, le plus souvent, constitue l'activité majeure des usines, répartie sur quelques semaines qui succèdent à la récolte provenant, pour l'essentiel, des cultures régionales plantées en variétés *Noir de Bourgogne* et *Royal de Naples*.

Ces conditions d'emploi des fruits, difficiles à modifier pour l'instant, permettent d'obtenir des jus et des produits utilisés en confiserie de qualité supérieure, et cette industrie nécessite un effort assez important de la part des fabricants. Aussi l'élaboration de ces produits, en cours d'année, est possible à partir de fruits conservés à des températures voisines de — 15°C mais demeure assez exceptionnelle.

La description de la technologie, dont nous rappelons les étapes dans ce tableau récapitulatif qui résume les différents gestes effectués dans une usine de grand rendement est hors de notre propos actuel. Néanmoins nous nous permettons de renvoyer le lecteur à un travail antérieur (H. BOUSCHARAIN et J. BERGERET, 1966) publié dans une revue spécialisée. Nous pensons que la lecture de la technologie des jus et produits dérivés — liqueurs et crèmes — apportera les précisions nécessaires à une meilleure compréhension du texte présent.

TABLEAU I

Tableau rappelant les différents stades de l'élaboration du jus de cassis et du jus de cassis-matière première



Les quantités de jus de cassis, considéré en tant que matière première pour la fabrication des nectars et boissons aromatisées, selon des normes précisées, ont augmenté assez considérablement depuis plusieurs années. En effet, comme le montre le tableau 2, de 1960 à 1965, la production française déclarée, exprimée en hectolitres, a triplé. Seule l'année 1964, où la récolte a été très faible, apporte une note dissonante à cette progression, surtout marquée entre 1960 et 1963.

Parallèlement, l'exportation du jus de cassis-matière première a pris un essor important qui représente environ les 2/3 de la production totale.

Au moment de l'élaboration de ce jus de cassis, il nous a paru souhaitable de compléter certaines observations déjà publiées (BOUSCHARAIN, 1964) et d'apporter des résultats nouveaux utilisables par les fabricants de ce jus. Par ailleurs, nous avons pu confirmer certaines conclusions antérieures.

TABLEAU 2

Production et exportation exprimées en hectolitres de jus de cassis-matière première de 1960 à 1965, d'après le « Secrétariat général de l'Union nationale des Producteurs et Distributeurs de Jus de Fruits et de Légumes »

Années	1960	1961	1962	1963	1964	1965
Production.....	1 874	3 454	6 223	6 459	3 952	6 500
Exportation.....	Aucune enquête n'a été faite					

Notre travail a donc été orienté vers des déterminations qui n'avaient pas, à notre connaissance, été faites au cours de la fabrication du jus de cassis.

1. *Les variations de l'indice des substances aromatiques volatiles*

L'indice des substances aromatiques volatiles est une notion relativement nouvelle que les chercheurs américains (POWER et CHESTNUT, 1901) et russes (NILOW et MALTABAR, 1957) ont précisé dans le cas du raisin et du jus de raisin en essayant d'en tirer une utilisation pratique.

Selon L. DEIBNER, pour DATOUNASCHVILI il est possible de prévoir deux dates de récoltes distinctes, une correspondant à une teneur maximum en substances aromatiques, l'autre à une teneur maximum en sucre.

En France, L. DEIBNER et H. RIFAI (1958) ont évalué les variations de l'indice des subtances volatiles des jus de raisins au cours de leur conservation. En 1965, l'évolution de cet indice au cours de la maturation de deux cépages rouges était étudiée par L. DEIBNER, J. MOURGUES et M. CABIBEL-HUGUES.

2. *La teneur en alcool méthylique*

Le cassis est un fruit particulièrement riche en matières pectiques et la dépectinisation est une phase importante dans l'élaboration du jus de fruit. Le dépectinisant attaque la pectine qui libère ainsi le méthanol et les acides pectiniques. Ces acides sont, à leur tour, transformés en acides pectiques non méthylés, avec libération d'alcool méthylique.

3. *L'acidité de titration et les glucides solubles*

Les variations de l'acidité de titration et du taux de glucides sont intéressantes à connaître dans la mesure où elles mettent en évidence le rôle de la technologie dans la composition chimique finale du jus.

II. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES ET PROTOCOLE OPÉRATOIRE

1. *Prélèvements*

Nous avons prélevé, aux différents postes de la fabrication un échantillon de 500 g environ, transporté immédiatement au laboratoire et analysé aussitôt.

2. *Méthodes analytiques*

a) *Indice des substances aromatiques volatiles.*

Le procédé retenu a été mis au point par V. NILOV, et déjà utilisé par L. DEIBNER et *al.* (1965). Les prises d'essai sont comprises entre 2,5 g et 10 g.

b) *Dosage du méthanol.*

La technique adoptée est décrite par Mme L. BOUZIGUES (1955). Elle est basée sur la mesure de l'intensité de coloration violette provoquée par l'oxydation sélective du méthanol en formol par le permanganate de potasse, en présence d'acide chromotropique.

c) *Dosage de l'acidité et des glucides solubles.*

L'acidité de titration exprimée en acide citrique monohydraté, est dosée en présence de bleu de bromothymol, selon la technique habituelle.

Les sucres, sont dosés par la méthode de BERTRAND et exprimés en glucose. Des essais préliminaires montrent qu'il n'y a pas de saccharose présent dans le fruit.

III. — RÉSULTATS

Les résultats sont consignés dans le tableau 3 qui contient toutes les déterminations que nous avons faites au cours de la fabrication d'un lot de jus de cassis-matière première en 1966.

TABLEAU 3

Fabrication 1966

Nos	Nature des prélèvements	I. S. A. V.	Méthanol	Acidité de titration	Glucides solubles
1	Fruits avant précuisson	28	6	3,2	6,5
2	Fruits après précuisson	29	31	3,1	5,8
3	Malaxage, dépectinisation	26	31	3,0	6,6
4	Jus de première presse	50	37	3,2	7,1
5	Dépôt de décantation du jus de 1re presse	1 060	39	3,5	—
6	Jus centrifugé	240	45	3,35	5,3
7	Résidu de centrifugation	585	15	2,05	—
8	Jus pasteurisé	63	35	3,15	7,5
9	Marc de première presse	115	52	1,95	3,45
10	Marc de première presse + eau à 80°C	34	10	0,75	1,3
11	Jus de deuxième presse	852	35	2,55	—
12	Jus de troisième presse	664	17	2,30	—
13	Marc de deuxième presse	458	17	1,60	—
14	Jus mélangé pasteurisé	122	33	3,05	6,6

L'indice de substances volatiles est exprimé en ml de thiosulfate de sodium N/5 rapporté à 100 g de produit frais, le méthanol en mg pour 100 g, l'acidité de titration en g d'acide citrique monohydraté pour 100 g, et les glucides totaux en g de glucose pour 100 g.

IV. — DISCUSSION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. *Indice des substances aromatiques volatiles*

L'indice des substances aromatiques volatiles ne varie pas après le broyage et la précuisson, stade qui n'a pour but que de favoriser la dépectinisation. Sa valeur est proche de celle que nous avons trouvée au cours d'une étude sur la cinétique de cet indice, dans le fruit (à paraître).

De même, la dépectinisation obtenue par 3 à 5 g de dépectinisant par kg de moût (temps de contact 30 à 60 minutes) n'a pas de répercussion sensible.

Après le pressurage des fruits dépectinisés, nous obtenons un jus de première presse, épais, dense, très coloré, contenant encore quelques débris de pellicules et de rafle, ainsi que des pépins, et représentant 50 à 60 p. 100 des fruits mis en œuvre. Une augmentation sensible est enregistrée, l'indice varie presque du simple au double, passant de 28-26 à 50.

Ceci est normal, car les substances aromatiques volatiles sont pour la plus grande part contenues dans la pulpe et la pellicule des baies.

Suivant la technologie décrite par ailleurs, le jus dépose, dans un premier temps, toutes les impuretés qu'il contient, dans de grands bacs en aluminium. Ce dépôt ne dépasse jamais 5 p. 100 de la quantité totale de fruits utilisés.

Il nous a paru intéressant d'évaluer la quantité de substances aromatiques du dépôt provenant de la décantation. Le résultat nous a surpris, car il n'est pas comparable aux teneurs précédemment trouvées. Cependant nous pouvons l'expliquer : nous avons déjà remarqué (Bouscharain, 1964) que le dépôt de décantation avait une tendance très affirmée à la fermentation et que, placé dans des bocaux même à à basse température (+ 2°C à 3°C), il ne se conservait pas : il fermentait très rapidement et formait ainsi de l'alcool éthylique, à partir du sucre que l'analyse ne retrouvait plus, car il était consommé.

Ce dépôt bourbeux contient des ferments suffisants à cette fermentation spontanée qu'il est facile de constater.

A ce stade de la fabrication, à partir du distillat mis en présence de la solution sulfochromique, on dose de l'éthanol, dont la formation masque les substances aromatiques volatiles.

Le jus décanté, centrifugé, déjà souillé par les impuretés constituant le dépôt, contient une quantité non négligeable d'alcool éthylique, tandis que le résidu de centrifugation, comme le dépôt de décantation, est un milieu très favorable à la fermentation, comme le montre le résultat obtenu.

Le jus pasteurisé a un indice de substances aromatiques volatiles beaucoup plus faible et comparable à celui du jus non décanté.

Nous pourrions être étonnés de la différence des valeurs des indices entre le jus centrifugé et le jus pasteurisé. Mais cette diminution très sensible s'explique : en effet le jus, pour assurer sa conservation est porté à une température de 80°-90°C, pendant un temps très court, puis ramené à 75°C.

Dès la pasteurisation, le jus de cassis chaud est stocké dans des tanks qui se

remplissent par le bas. Ainsi le jus est mis en présence d'une grande quantité d'air, et la période de refroidissement qui est longue, environ 2 à 3 jours, est très propice à une perte sensible d'arôme.

L'analyse des liquides de deuxième et de troisième presses, provenant du pressurage des marcs additionnés d'eau et laissés au repos 2 heures environ, donne des résultats qui montrent qu'une fermentation s'est opérée pendant la manipulation. Ce fait est à relier avec l'absence de sucre dans ces échantillons.

Le marc de deuxième presse est encore relativement riche en corps volatiles, tandis que le jus de cassis-matière première, provenant du mélange des 3 pressurages successifs, aéré, lors du remplissage des tanks, refroidi lentement, perd une quantité importante de son arôme.

TABLEAU 4

Conversion de l'indice de substances aromatiques volatiles en alcool éthylique pur

Nos	Nature des prélèvements	I. S. A. V.	Éthanol
1	Fruits avant précuisson	28	0,08
2	Fruits après précuisson	29	0,08
3	Malaxage, dépectinisation	26	0,075
4	Jus de première presse	50	0,14
5	Dépôt de décantation du jus de 1re presse	1 060	3,07
6	Jus centrifugé	240	0,70
7	Résidu de centrifugation	585	1,70
8	Jus pasteurisé	63	0,18
9	Marc de première presse	115	0,33
10	Marc de première presse + eau à 80°C	34	0,10
11	Jus de deuxième presse	852	2,47
12	Jus de troisième presse	664	1,92
13	Marc de deuxième presse	458	1,32
14	Jus mélangé pasteurisé	122	0,35

L'indice de substances aromatiques volatiles est exprimé en ml de thiosulfate de sodium N/5 pour 100 g.

Les quantités d'éthanol sont exprimées en ml pour 100 g (1 ml de $S_2O_3Na_2$ N/5 = 0,002 9 ml d'alcool éthylique pur).

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de convertir les quantités consommées de thiosulfate de sodium en alcool éthylique, et nous voyons que ce mode d'expression met bien en évidence les divers stades où la fermentation a lieu. Les prélèvements correspondants ne contiennent pas de glucose. Compte tenu du rendement en jus de cassis-matière première, par rapport aux fruits utilisés, on peut penser que le jus mélangé pasteurisé, pouvant être utilisé à la fabrication de cocktails et des nectars, contient une proportion non négligeable d'éthanol (environ 0,25 ml pour 100 g) présent à côté des substances aromatiques du fruit. Cette conversion fait l'objet du tableau 4.

2. *Alcool méthylique*

La quantité d'alcool méthylique contenue dans les grappes de cassis fraîches et entières est faible, tandis que l'échantillon recueilli après chauffage à 37°C et broyage est nettement plus riche.

La dépectinisation enzymatique est réalisée par addition au moût de cassis de 3 à 5 g d'enzyme obtenu à partir d'extraits de culture d'*Aspergillus niger* par kg de fruit. Le temps de contact, après homogénéisation, est de 50 à 60 minutes.

Sachant, par expérience, que la baie de cassis est très riche en matières pectiques nous nous attendions à trouver des quantités importantes d'alcool méthylique.

Or, il n'en a rien été. Au contraire le résultat obtenu a simplement confirmé la teneur évaluée au stade précédent de la fabrication du jus de cassis.

Cette constatation, pour si étonnante qu'elle soit, peut s'expliquer par plusieurs observations.

Nous pensons d'une part, que le temps de contact entre le dépectinisant et le moût de cassis est nettement insuffisant. Il faudrait, pour que la dépectinisation soit effective, qu'un minimum de 2 heures soit respecté. En fait, les fabricants de dépectinisants recommandent pour obtenir la destruction du gel, d'attendre de 2 à 4 heures, la clarification ultime du jus étant obtenue par une deuxième action diastasique, la dose de dépectinisant étant de 1 g environ par litre de jus.

Mais, dans le cas étudié il faut tenir compte du rendement industriel qui oblige à un certain rythme de production. En effet, le temps — trop court — du stade de la dépectinisation proprement dite paraît compensé pendant les phases suivantes.

Par ailleurs, le moût de cassis est à 25°C environ, alors qu'une température relativement élevée est nécessaire pour obtenir un maximum d'action enzymatique.

Des essais préliminaires montrent en effet que la température requise pour dépectiniser se situe aux environs de 45°C. Pour une température plus basse, il est nécessaire d'ajouter une quantité de diastase supérieure à la dose utilisée.

Enfin, la pulpe de cassis est très acide. En acide citrique monohydraté, son acidité de titration est de 3,2 g pour 100 g de jus, tandis que le pH est voisin de 3,3. Or l'action du dépectinisant est favorisée quand il agit sur des substrats peu acides.

Toutes ces remarques montrent qu'au stade proprement dit de dépectinisation, l'action diastasique est à peine commencée. Pour des raisons de rendement, il n'est pas possible de prolonger le contact quand, dans les phases suivantes, la destruction des matières pectiques se poursuivra.

La justification de ces observations apparaît dans les taux de méthanol trouvés dans le jus de première presse, dans le dépôt de décantation et surtout dans le jus centrifugé où nous trouvons des taux plus élevés.

C'est dans le marc de première presse, phase de fabrication au cours de laquelle le dépectinisant est en contact le plus long avec les fruits que nous trouvons le taux de méthanol le plus élevé : ici, des conditions meilleures sont réunies pour détruire les matières pectiques. Par ailleurs l'acidité du marc est plus faible que celle du jus. Ceci nous permet d'extraire un jus de deuxième presse contenant une quantité d'alcool méthylique importante, tandis que le marc restant et le jus de troisième presse sont très appauvris, pour obtenir enfin un jus pasteurisé, mélange final, dont la teneur est comparable à celle que nous avons déterminée lors de l'analyse de nectars commerciaux.

3. *Acidité de titration et glucides solubles*

Ces dernières déterminations, effectuées pour vérifier des analyses antérieures confirment nos précédentes conclusions, et sont en relation, compte tenu des remarques que nous avons formulées, avec l'indice de matières volatiles et les quantités de méthanol. De plus, la présence de sucre non réducteur (saccharose) n'a jamais été décelée.

Les résultats obtenus n'ont pas de portée générale. Ils ont été obtenus à partir d'échantillons prélevés aux différents stades de la fabrication de jus de cassis-matière première, issu d'un lot de fruits dont les caractéristiques ne sont pas forcément identiques à celles d'autres récoltes de cassis. Mais nous pensons qu'ils ont le mérite de montrer que le déroulement des phases d'élaboration du jus de fruit a un retentissement certain sur la qualité du produit fini.

Ainsi, à côté des matières aromatiques volatiles qui se dégagent au cours de la fabrication, une fermentation inévitable qui se manifeste spontanément est mise en évidence. Ces fermentations ont lieu surtout aux stades de fabrication qui correspondent à la décantation des jus. A ces stades, les jus abandonnent une quantité importante de dépôt, riche en ferments qui rendent possible une fermentation. Les jus de deuxième presse et de troisième presse qui rejoignent dans les bacs de décantation les jus de première presse en vue de l'obtention du jus mélangé pasteurisé sont donc naturellement souillés.

Les teneurs en alcool méthylique assez élevées sont en relation avec la grande quantité de matières pectiques contenues dans ce fruit très acide et sucré.

Reçu pour publication en septembre 1967.

SUMMARY

DIFFICULTIES IN INTERPRETING THE INDEX OF VOLATILE AROMATIC SUBSTANCES FROM BLACKCURRANT JUICE. VARIATIONS IN THIS INDEX, IN METHANOL CONTENT, IN ACIDITY, AND THE SOLUBLE GLUCOSIDES DURING MANUFACTURE

After raw blackcurrant juice had been prepared, the volatile aromatic substances in samples taken at each stage of fabrication were determined.

The aroma was also evaluated in samples collected during various stages of processing.

The results showed that the chemical method used made it possible for ethanol arising from spotaneous fermentation in the samples to interfere with the estimates of volatile aromatic substances present. When the methyl alcohol liberated by enzymatic depectinization was determined, it was found to be evolved not only at the depectinization stage, a phase too rapid in the industrial process, but also during subsequent operations where the conditions for pectolytic action are better.

RIASSUNTO

SULLE DIFFICOLTA D'INTERPRETAZIONE DEL INDICE DELLE SOSTANZE AROMATICHE VOLATILI DEL SUCCO DI RIBES NERO. VARIAZIONI DI QUESTO INDICE, DEL TENORE IN METANOLO, DELL'ACIDITA E DEI GLUCIDI SOLUBILI, NEL SCORO DELLA FABBRICAZIONE

Dopo la tecnologia del succo di ribes nero, impiegato come materia prima, sono determinate le sostanze aromatiche volatili dei prelevamenti fatti ad ogni stato di fabbricazione. Cosi é valutato l'aroma di ogni campione ai diversi stadi dell' elaborazione del succo di frutta.

L'interpretazione dei risultati dimostra che il metodo chimico impiegato rende possibile una confusione fra i contenuti in sostanze aromatiche volatili e la quantità di etanolo eventualmente presente, proveniente da una fermentazione spontanea nei campioni analizzati.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOUSCHARAIN H., BERGERET J., 1966. Les Industries du cassis en Côte-d'Or, technologie des jus et produits dérivés, liqueurs et crèmes. *Industr. aliment. agric.*, **12**, 1609-1620.

BOUSCHARAIN H., 1964. *Contribution de la composition chimique du cassis au cours de la maturation et de sa transformation technologique en jus de fruits.* Thèse Université, mention Sciences, Dijon.

BOUZIGUES L., 1955. Sur le dosage du méthanol en présence d'éthanol par électrophotométrie. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 223-234.

DEIBNER L., MOURGUES J., GABIBEL-HUGUES M., 1965. Évolution de l'indice des substances aromatiques volatiles des raisins de deux cépages rouges au cours de leur maturation. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 5-14.

DEIBNER L., RIFAI H., 1958. Variations de l'indice des substances volatiles des jus de raisins au cours de leur conservation. *Ann. Technol. agric.*, **7**, 21-29.

NILOV, MALTABAR, 1957. Appréciation des variétés de raisins pour la production du cognac et pour la détermination de la date de la récolte (en russe). *Troudy Vses. Naoutch. Izled. Inst. Vinod. Vinogr., Magaratch*, fasc. **5**, 5-16.

POWER F., CHESTNUT V., 1921. The occurence of methylanthranilate in grape juice. (L'incidence de l'anthranilate de méthyle dans le jus de raisin). *Amer. Chem. J.*, **43**, 1741.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (3), 279.

CHRONIQUE DES LIVRES

CONSERVATION DES FRUITS ET LÉGUMES (notamment en atmosphère contrôlée). — ENTREPÔTS FRIGORIFIQUES. — Paris, Institut international du Froid, 1966, 650 p.

Cet ouvrage, qui appartient à la collection « Science et technique du Froid » sous le titre de laquelle l'Institut international du Froid publie les rapports et discussions développés au cours des réunions de ses commissions scientifiques et techniques, rend compte des travaux de la Commission IV (Applications du froid aux denrées alimentaires et aux produits agricoles) et de la Commission V (Entrepôts frigorifiques et fabriques de glace) réunies à Bologne (Italie) en juin 1966.

Soixante-dix-sept études y sont présentées sous la signature d'experts en matière de conservation des fruits et légumes et d'entrepôts frigorifiques parmi les plus qualifiés d'Afrique du Sud, d'Allemagne, du Canada, des États-Unis, de France, d'Italie, de Pologne, du Royaume-Uni, de Suisse, d'U. R. S. S., etc.

Le principal sujet traité est l'entreposage des fruits et légumes en atmosphère contrôlée, aussi bien du point de vue du comportement des produits que de la construction des installations. Les 27 rapports qui y sont consacrés dans la première section de l'ouvrage, font le point des dernières connaissances sur cette question.

Dans une deuxième section sont regroupées 10 études concernant l'influence des traitements préalables à l'entreposage sur le comportement au froid des fruits et légumes.

Dix-sept autres rapports étudiant les problèmes d'actualité se rapportant à la conservation frigorifique des fruits et légumes (qualité, pertes de poids, etc.) forment la troisième section de cette publication.

La quatrième partie (23 rapports) traite plus spécialement des entrepôts frigorifiques, de la fabrication de la glace, de la congélation rapide et de la réfrigération de la viande.

Outre les discussions auxquelles ont donné lieu ces études, des résumés substantiels en anglais et français accompagnent chacun des rapports.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviation ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention: avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire :* résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds les dons... ; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet* placé en tête de l'article. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de et *al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatres langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon le World List of Scientific Periodicals, où le Bulletin Signalétique du C. N. R. S. ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communication personnelle » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.

Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est : 16 × 24 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront deux épreuves à corriger. Les corrections « d'auteur » ne sont autorisées que sur le premier jeu d'épreuves.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des produits végétaux, 11 - Narbonne France, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas. Envoyer deux exemplaires.

Technologie agricole

Le Directeur-Gérant : M. L. Cagnac

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 1-1968.

Dépôt légal : 1er trimestre 1968. N° d'impression : 1337.

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 16 1967 NUMÉRO 4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique, à l'exception des sommaires et résumés

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (4), 287-299.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU LAIT SUR LA QUANTITÉ DE SUBSTANCE SÈCHE DE « FROMAGE » OBTENUE APRÈS COAGULATION PAR LA PRÉSURE

J.-L. MAUBOIS, * G. MOCQUOT ** et E. BLANC-PATIN ***
avec la collaboration technique de J.-Y. DUPONT * et Édith MAUBOIS *

* *Laboratoire de Recherches de Technologie laitière, Centre de Recherches agronomiques de l'Ouest, 35 - Rennes*
** *Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux, Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas*
*** *Station expérimentale laitière, 39 - Poligny*
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Une augmentation du rendement en substance sèche dégraissée de « fromage » (caillé égoutté mais non acide) peut être obtenue grâce à l'emploi de lait concentré. Nous avons montré que cette augmentation du rendement avait deux origines : pour la plus grande part, l'apport de substance sèche résultant de la présence dans le « fromage » d'un lactosérum plus concentré et pour une part plus faible, une rétention plus grande des sels phosphocalciques dans le coagulum de lait concentré.

Nous avons également montré que l'aptitude à la coagulation de la caséine de lait concentré était identique à celle du lait normal.

INTRODUCTION

Dans une publication antérieure (MAUBOIS et MOCQUOT, 1967), nous avons comparé le caillé baignant dans le lactosérum et le fromage égoutté (et éventuellement pressé) à une éponge, d'abord plongée dans l'eau de mer, puis essorée. Selon que l'essorage de l'éponge est plus ou moins intense, plus ou moins poussé, il laisse dans cette éponge une quantité d'eau de mer plus ou moins grande.

La substance sèche de l'éponge imprégnée d'eau salée est donc formée d'une part, de la substance sèche de l'éponge proprement dite et d'autre part, des sels provenant de l'eau de mer.

Le cas du fromage est identique : sa substance sèche comprend d'une part, la matière sèche du coagulum de paracaséine qui correspond à l'éponge et d'autre part, la matière sèche du lactosérum qui imprègne encore le fromage, une fois l'égouttage (et éventuellement le pressage) terminé (s).

La dose de sel retenue par l'éponge ne varie pas seulement avec le degré d'essorage ; elle dépend également de la teneur en sel de l'eau de mer. Plus cette eau est concentrée en sel et plus grande est la quantité de sel retenue pour une même teneur en eau (ou en substance sèche totale) de l'éponge essorée. Il en va de même pour le fromage : si un lactosérum est très riche en substance sèche, le fromage obtenu contiendra, pour la même teneur en eau, c'est-à-dire pour le même degré d'égouttage ou de pressage, une proportion de substance sèche de lactosérum plus élevée que celle contenue dans un fromage correspondant à un autre lactosérum plus pauvre en substance sèche.

Les quantités de substance sèche qui proviennent respectivement du lactosérum et du coagulum de paracaséine (et dont la somme forme la matière sèche totale du fromage) peuvent donc varier :

1° suivant le degré d'égouttage ;
2° suivant le degré de concentration du lactosérum.

En reprenant l'image de l'éponge et de l'eau de mer, on voit fort bien que, si l'on prend une cuvette remplie d'une certaine quantité *connue* d'eau légèrement salée et que l'on y plonge l'éponge, celle-ci une fois sortie de la cuvette et essorée, contiendra après complète dessication, une dose déterminée de sel (relativement faible) par rapport à la substance sèche totale de l'éponge. Si l'on reprend la même cuvette, remplie de la même quantité d'eau légèrement salée et qu'on évapore, grâce à un moyen *ad hoc*, une partie de cette eau jusqu'à ce que la concentration en sel ait augmenté de 10, 20 ou 30 p. 100, on conçoit, comme nous l'avons indiqué plus haut, que la même éponge, une fois plongée dans l'eau salée concentrée, puis essorée comme précédemment contiendra plus de sel dans sa substance sèche totale que lors de la première opération.

Autrement dit, à partir du *même* poids sec d'éponge et du *même* poids sec total de sel contenu dans la cuvette, nous obtiendrons *grâce à la concentration* que nous avons effectuée un poids sec *d'éponge salée essorée* plus grand lors de la seconde opération que lors de la première.

Si l'on applique au fromage le raisonnement qui vient d'être fait à propos de l'éponge, cela signifie, qu'à partir d'une *même* quantité de substance sèche de lait mise en œuvre, nous obtiendrons avec un lactosérum plus concentré une quantité de substance sèche totale de fromage accrue et que cet accroissement résultera de l'augmentation de la proportion de matière sèche provenant du lactosérum dans le fromage final.

La question qui se pose est de savoir si :

1° l'augmentation de rendement *effectivement constatée* (Ardebili et *al.*, 1964 ; Anonyme, 1964) lorsqu'on compare des fromages de lait normal et des fromages de lait concentré correspond bien à celle que l'on peut *prévoir* en se basant sur les considérations qui précèdent ;

2° le degré de concentration *final* intervient seul dans l'augmentation de rendement, ou bien si une concentration plus poussée d'abord, suivie d'une redilution

(ARDEBILI et *al.*, 1964 ; Anonyme, 1964 ; Brevet français, 1962) à un taux de substance sèche supérieur au taux primitif aboutit à un résultat différent (par exemple à une augmentation plus forte du rendement).

Le but du présent travail est d'apporter une réponse à ces questions. Mais, étant donné le nombre assez grand de facteurs qui interviennent dans la fabrication du fromage lorsqu'on en considère tous les aspects (coagulation par la présure, acidification par les levains lactiques, etc.), nous avons préféré étudier chacun de ces facteurs séparément. Ce travail est donc limité, pour l'instant, à l'étude de l'action de la concentration sur la quantité de substance sèche obtenue après coagulation par la présure. L'influence éventuelle de l'acidification, avec ses diverses modalités, fera l'objet d'un travail ultérieur.

Dans ce travail, compte tenu des publications antérieures, nous nous sommes également attachés d'une part à vérifier la source d'augmentation du rendement en substance sèche dégraissée que nous avons déjà signalée (MAUBOIS et *al.*, 1964) et qui provient de la rétention supplémentaire de sels phosphocalciques dans le coagulum issu de lait concentré (ce phénomène viendrait se « surajouter » au phénomène de « l'éponge » décrit plus haut) ; d'autre part, nous avons recherché s'il n'y avait pas une autre source possible d'augmentation du rendement au niveau de l'aptitude à la coagulation de la caséine (ARDEBILI et *al.*, 1964).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Lait et laits concentrés utilisés

Le lait cru provenant de la traite du troupeau de vaches du C. N. R. Z. était écrémé et chauffé à 70°C pendant 2 minutes (ce chauffage correspondait sensiblement à celui que subit le lait de fromagerie dans les usines laitières).

Une portion du lait écrémé était ensuite concentrée à un taux de substance sèche égal à 3 fois celui du lait originel (ARDEBILI et *al.*, 1964 ; Anonyme, 1964 ; Brevet français, 1962). Une autre portion était concentrée à un taux de substance sèche égal à 1,3 fois celui du lait original (MAITRE, 1966). La concentration était effectuée sous vide à une température voisine de 25°C. Une troisième portion servait de lait témoin.

Les laits témoin et concentrés étaient conservés une nuit au réfrigérateur (+ 4°C).

Préparation du coagulum de chacun des laits (témoin et concentrés)

Le lait témoin (500 ml) et le lait concentré 1,3 fois (385 ml) étaient emprésurés (0,1 ml de présure de force 1/10 000) après réchauffage à 32°C. Le lait concentré 3 fois (167 ml) était emprésuré à 14°C ; après 5 à 10 mn à cette température, on ajoutait une quantité exactement pesée d'eau chaude de façon à ramener la teneur en substance sèche à une valeur un peu supérieure à celle du lait témoin (environ 1,3 fois la teneur en substance sèche du lait témoin). La température de l'eau était réglée de façon que la température du mélange final soit de 32°C.

Aussitôt après l'addition de présure pour les laits témoin et concentré 1,3 fois et après l'addition d'eau chaude pour le lait concentré 3 fois, une quantité convenable (environ 30 ml) de chacun des laits était introduite dans des tubes de centrifugeuse préalablement tarés. Les tubes étaient bouchés, pesés et maintenus au bain-marie à 32°C. Une partie aliquote de chacun des laits emprésurés était aussitôt soumise à l'analyse.

Au bout d'un temps exactement mesuré (15 mn) après la coagulation du lait, les tubes de centrifugeuse étaient retirés du bain-marie et centrifugés à 12 700 *g* pendant 20 mn à 15°C.

Aussitôt après la centrifugation on décantait d'abord le lactosérum surnageant puis on retournait le tube en le maintenant en position verticale, ouverture tournée vers le bas, pendant 30 secondes. De cette façon, les dernières portions de lactosérum s'égouttaient dans des conditions bien déter-

minées et reproductibles. L'ensemble du lactosérum était pesé. Le tube était replacé en position normale (ouverture vers le haut) et pesé (on obtenait ainsi le poids du coagulum). Le coagulum *in toto* et le lactosérum étaient alors soumis aux différentes opérations analytiques (on préparait autant de tubes de coagulum que cela était nécessaire pour l'ensemble des déterminations).

Dans le reste du texte nous avons désigné ce coagulum égoutté par centrifugation par le mot « fromage ». Toutefois, il convient de rappeler qu'aucune acidification résultant du développement des bactéries lactiques ne s'était produite au moment où ce « fromage » était soumis à l'analyse.

Dosage des matières azotées

— Par microkjeldahl. La teneur en azote multipliée par 6,38 donne la teneur en matières azotées.

— La proportion de matières azotées coagulables dans les matières azotées totales a été calculée selon les indications de RICORDEAU et MOCQUOT (1967).

Dosage du calcium

Le calcium total du lait et du lactosérum était dosé selon la méthode décrite par JENNESS, (1953), celui des « fromages » par précipitation à l'état d'oxalate à partir des cendres.

Dosages de la teneur en substance sèche

Les teneurs en substance sèche du lait, du lactosérum et du « fromage » étaient déterminées selon une seule et même méthode : 5 ml de lait ou de lactosérum ou 3 à 5 g de « fromage » étaient desséchés à 102°C-105°C pendant 16 h dans une capsule contenant 25 g de sable.

Expression des résultats

1. *Augmentation de rendement en substance sèche observée sur le « fromage ».*

L'augmentation du rendement en substance sèche dégraissée (ou « rendement maigre ») résultant de l'emploi de lait concentré a été exprimée comme nous l'avons suggéré dans une publication antérieure (MAUBOIS et MOCQUOT, 1967) : si r_1 est la quantité de substance sèche dégraissée restant dans le « fromage » témoin et si R_1 est la quantité de substance sèche dégraissée restant dans le « fromage » de lait concentré (r_1 et R_1 correspondant, l'un comme l'autre, à 100 g d'extrait sec dégraissé de lait mis en œuvre) on peut calculer une augmentation relative du rendement en substance sèche dégraissée égale à $\frac{R_1 - r_1}{r_1} \times 100$.

Mais, comme nous l'avons récemment exposé et montré, un tel calcul ne signifie rien [1] si les teneurs en eau des « fromages » obtenus diffèrent entre elles, même légèrement. L'expérience nous a montré (cf. par exemple tabl. 1) qu'avec des conditions de centrifugation identiques la teneur en eau des « fromages » obtenus variait sensiblement d'un essai à l'autre (influence de l'échantillon de lait de vache servant à l'expérience) et plus légèrement à l'intérieur d'un même essai. Aussi avons-nous calculé des rendements, r_2 et R_2, correspondant respectivement (toujours pour 100 g d'extrait sec dégraissé de lait mis en œuvre) aux « fromages » obtenus à partir des laits témoin et concentré, tels que leur teneur en substance sèche soit égale à une valeur fixe, choisie comme valeur de référence pour tous les essais : 26,8 g de substance sèche dégraissée pour 100 g de fromage maigre [2]. L'augmentation du « rendement maigre » du « fromage » de lait concentré par rapport au témoin est alors exprimée par le rapport $\frac{R_2 - r_2}{r_2} \times 100$.

2. *Augmentation de rendement calculée.*

a) *Augmentation de rendement due à la matière sèche supplémentaire apportée par un lactosérum plus concentré.*

Selon l'hypothèse formulée plus haut, la partie insoluble du fromage, c'est-à-dire la paracaséine avec les sels minéraux qui lui sont associés, formant le complexe que l'on désigne habituelle-

[1] On ne peut, en effet, prétendre qu'un certain procédé *e* améliore le rendement en fromage par comparaison avec un procédé *t* pour la seule raison que le procédé *e* permet d'obtenir des fromages à plus forte teneur en eau (MAUBOIS et MOCQUOT, 1967).

[2] Cette valeur a été choisie parce qu'elle correspond au cas, fréquent en pratique, de fromages à pâte molle contenant 40 p. 100 de substance sèche et 45 p. 100 de matière grasse dans la substance sèche ; un tel fromage supposé dégraissé renferme alors 26,8 g de substance sèche pour 100 g de fromage (MAUBOIS et *al.*, 1965).

ment sous le terme de phosphoparacaséinate de calcium), et la partie soluble (c'est-à-dire le lactosérum), sont comparables, respectivement, à une éponge et à de l'eau salée. Si cette hypothèse est exacte, et en supposant que l'on part chaque fois de la même quantité (100 g) d'extrait sec de lait, le phosphoparacaséinate de calcium, à l'instar de l'éponge, ne doit pas varier de poids, que le lait ait été concentré ou non. Par contre, le lactosérum concentré, de même qu'une eau plus salée, augmente la quantité de substance sèche soluble présente dans le « fromage » lorsque ce dernier provient d'un lait qui a subi lui-même une certaine concentration. Du même coup, le poids de fromage humide augmente aussi si l'on suppose que ce dernier possède une teneur en eau constante. Dans la mesure où l'augmentation de rendement résultant de la présence d'un lactosérum plus concentré coïncide avec l'augmentation observée par l'analyse directe du « fromage » il est permis de conclure que l'hypothèse de départ se trouve vérifiée.

Il s'agit donc de calculer la différence des quantités de substance sèche de lactosérum présentes respectivement dans les « fromages », témoin et concentré, en se basant sur les données analytiques recueillies pour les laits et les lactosérums correspondants. En d'autres termes, il s'agit de vérifier si l'augmentation calculée (Ac) à partir des données relatives aux laits et aux lactosérums témoins et concentrés est égale, ou non, à la valeur $\left(\frac{R_2 - r_2}{r_2}\right)$ mentionnée plus haut et qui concerne les fromages.

Rappelons (cf. MAUBOIS et *al.*, 1965) que le rendement du lait en substance sèche de « fromage » s'obtient de la manière suivante :

Si (a) est la teneur en substance sèche du lait témoin,
(s) la teneur en substance sèche du lactosérum témoin,

la quantité de substance sèche (x) à retirer de (a) g de substance sèche de lait (sous forme de lactosérum) pour obtenir ($a - x$) g de substance sèche de « fromage » de teneur en substance sèche (F) est égale à :

$$x = \frac{s(F - a)}{F - s} \tag{1}$$

Pour 100 g d'extrait sec de lait mis en œuvre, la quantité de substance sèche de « fromage » obtenue (r) est égale à $\frac{(a - x)}{a} \cdot 100$ soit :

$$r = \frac{F \cdot (a - s) \cdot 100}{a(F - s)} \tag{2}$$

Le poids de « fromage » humide correspondant est égal à :

$$p = \frac{(a - s)}{a(F - s)} 10^4 \tag{3}$$

Appliquons maintenant ces formules. Supposons que (r'_2) et (p'_2) correspondent aux poids calculés (à partir des données analytiques concernant les laits et les lactosérums) de substance sèche et humide du « fromage » de lait témoin et que de même (R'_2) et (P'_2) s'appliquent au « fromage » de lait concentré.

D'autre part la quantité de matière sèche de lactosérum contenue dans 100 g de « fromage » (de teneur en substance sèche F) s'obtient de la manière suivante :

si (y) est la quantité d'eau libre contenue dans 100 g de « fromage »,
si (N) est la quantité d'eau liée au phosphoparacaséinate de calcium contenu dans 100 g de « fromage », on a :

$$100 - (F + N) = y \tag{4}$$

si l'on admet (PYENSON et DAHLE, 1938 ; MOCQUOT, 1947 ; DAVIES et WHITE, 1960) que la quantité d'eau liée est égale à la moitié de la quantité de phosphoparacaséinate de calcium contenue dans 100 g de « fromage » (1) ou, ce qui revient au même, que la quantité de phosphoparacaséinate de calcium est le double de la quantité d'eau liée, on peut écrire :

$$\underset{\substack{\text{phosphoparacaséinate}\\ \text{de calcium}}}{2N} + \underset{\substack{\text{substance sèche}\\ \text{de lactosérum}}}{y \cdot \frac{s}{100 - s}} = \underset{\substack{\text{substance sèche du fromage}\\ \text{correspondant à 100 g de fromage humide}}}{F} \tag{5}$$

(1) La caséine, la paracaséine ou le phosphoparacaséinate de calcium retiennent plus « d'eau liée » par gramme de matière sèche que n'en retiennent l'ensemble des constituants du lactosérum (le lactose ne retient que très peu d'eau liée et, si les protéines du lactosérum en retiennent autant et même plus que la caséine

La résolution des équations (4) et (5) montre que

$$\frac{y \cdot s}{100 - s} = \frac{(200 - 3F) \cdot s}{200 - 3s} \tag{6}$$

Désignons par (s) et (S) les teneurs en substance sèche des lactosérums témoin et concentré ; on voit que, si les quantités de substance sèche de lactosérum retenues dans le fromage sont seules responsables de la différence $z = R'_2 - r'_2$ celle-ci peut s'écrire, pour des poids de « fromage » humides correspondant respectivement à P'_2 et p'_2 grammes de fromage

$$z = \frac{(200 - 3F)\, S \cdot P'_2}{(200 - 3S)\, 100} - \frac{(200 - 3F)\, s \cdot p'_2}{(200 - 3s)\, 100} \tag{7}$$

(p'_2) est donné par l'équation (3). Quant à (P'_2) on peut écrire l'équation suivante :

$$\frac{z + r'_2}{P'_2} = \frac{F}{100} \tag{8}$$

On obtient, tous calculs faits :

$$z = \frac{F\,(a - s)\,(200 - 3F)\,100\,(S - s)}{a\,(200 - 3s)\,(F - S)\,(F - s)} \tag{9}$$

Finalement on exprime l'augmentation du « rendement maigre » du « fromage » de lait concentré par rapport au témoin comme il est dit plus haut ; (Ac) est égale à $\frac{z \times 100}{r'_2}$ et on obtient après simplification :

$$Ac = \frac{(200 - 3F)\,100\,(S - s)}{(F - S)\,(200 - 3s)} \tag{10}$$

Si l'on remplace F par sa valeur numérique (26,8), l'équation (10) devient :

$$Ac = \frac{11\,950\,(S - s)}{(26{,}8 - S)\,(200 - 3s)} \tag{11}$$

b) *Augmentation du rendement due à la rétention des sels phosphocalciques.*

Nous avons suivi, pour sa détermination, le procédé de calcul déjà indiqué (MAUBOIS et *al.*, 1965).

L'augmentation du « rendement maigre » due à la concentration du lactosérum était ajoutée à celle due à la rétention des sels phosphocalciques dans le coagulum de lait concentré. La somme obtenue était comparée à l'augmentation du « rendement maigre » observée à partir de l'analyse des fromages.

RÉSULTATS

Le tableau I donne le résultat des déterminations analytiques effectuées lors de nos essais.

(PYENSON et DAHLE, 1938), leur proportion dans le « fromage » est faible (dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placés) par rapport à la quantité de paracaséine présente.

Donc, à teneur en eau égale, le « fromage » de lait concentré contient, par gramme, plus d'eau libre et moins d'eau liée que le « fromage » de lait normal. Comme l'eau libre peut seule dissoudre la matière sèche du lactosérum, l'augmentation du « rendement maigre » due au lactosérum résultera non seulement de la concentration du lactosérum mais aussi de l'augmentation de la proportion d'eau libre que cette concentration entraîne.

Le tableau 2 donne les « bilans de fabrication » et les augmentations de rendement en « fromage » observées et calculées. On constate que :

1° avec la technique adoptée, les « bilans de fabrication » sont satisfaisants : le poids de « lait emprésuré » est égal à la somme des poids frais de « caillé » et de lactosérum.

TABLEAU I

Déterminations analytiques

N° des essais		1	2	3	4	5
Poids du lait (g)	T*	356,4	215,6	216,9	215,4	280,1
	C*	350,5	186,1	182,9	186,9	301,6
	*c**	346,3	186,7	190,2	185,7	280,7
Extrait sec en g/100 g de lait	T	9,35	8,66	8,62	8,57	9,28
	C	8,46	11,26	11,23	11,14	12,14
	c	11,73	11,42	11,45	11,76	13,91
Calcium en g/100 g de lait	T	0,117	0,119	0,116	0,111	0,116
	C	0,112	0,151	0,149	0,142	0,149
	c	0,145	0,155	0,153	0,148	0,172
Poids du « fromage » (g)	T	36,4	27,8	26,9	22,8	42,2
	C	32,8	28,3	29,6	30,5	63,3
	c	46,4	29,6	32,4	29,6	70,7
Extrait sec en g/100 g de « fromage »	T	33,3	24,3	24,95	27,2	24,1
	C	32,6	27,1	26,8	25,3	24,3
	c	32,8	27,0	26,3	26,6	24,7
Extrait sec en g/100 g de lactosérum	T	6,72	6,37	6,20	6,41	6,79
	C	5,89	8,28	8,25	8,31	9,04
	c	8,52	8,36	8,44	8,93	10,45
Calcium en g/100 g de lactosérum	T	0,035	0,041	0,036	0,042	0,037
	C	0,028	0,045	0,039	0,046	0,040
	c	0,037	0,049	0,043	0,054	0,050

T* : Témoin.
C* : Concentré 3 fois et redilué.
*c** : Concentré légèrement.
* : Le taux de concentration final est indiqué dans le tableau 2.

La somme des substances sèches de lactosérum et de caillé est sensiblement égale à la substance sèche du lait (différence relative inférieure à ± 1 p. 100).

Ce point qui peut sembler élémentaire est cependant important : dans la fabrication du fromage proprement dit, il est souvent difficile de se rendre maître de certaines sources d'erreurs dans les bilans (poids frais ou substance sèche) : difficultés d'un échantillonnage représentatif, pertes par évaporation, pertes de caillé ou de lactosérum, etc.).

2° L'effet de la concentration est sensiblement le même quel que soit le processus opératoire adopté (concentration du lait à un taux de substance sèche triple de la valeur primitive suivie d'une redilution, ou concentration à 1,3 fois environ sans redilution ultérieure), c'est-à-dire que seule la concentration finale du lait emprésuré joue un rôle dans l'augmentation de rendement observée par rapport au fromage témoin.

TABLEAU 2

Résultats

Numéro des essais	Nature des laits	Différence relative sur le bilan		Augmentation de rendement			
		du poids frais (1)	de l'extrait sec (2)	Calculée (3)	Calculée (4)	Calculée Totale (5)	Observée (6)
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	Lait témoin	0	0,9				
	Lait concentré 3 fois redilué à 0,90....	0	— 0,3	— 2,6	0,2	— 2,4	— 2,0
	Lait concentré 1,25..	0	0,5	6,5	0,4	6,9	4,7
2	Lait témoin	0	0,5				
	Lait concentré 3 fois redilué à 1,30....	0	— 0,8	6,8	0,5	7,3	5,2
	Lait concentré 1,32	0	— 0,7	7,1	0,3	7,4	7,6
3	Lait témoin	0	— 0,9				
	Lait concentré 3 fois redilué à 1,30....	0	0,5	7,3	0,5	7,8	10,1
	Lait concentré 1,33..	0	0,3	8,0	0,3	8,3	10,3
4	Lait témoin	0	— 0,1				
	Lait concentré 3 fois redilué à 1,30....	0	— 0,4	6,8	0,5	7,3	6,9
	Lait concentré 1,37	0	0,1	9,3	0,3	9,6	6,5
5	Lait témoin	0	0,9				
	Lait concentré 3 fois redilué 1,32.....	0	0,9	8,4	0,5	8,9	6,3
	Lait concentré 1,50..	0	0,2	14,9	0,3	15,2	12,2
Moyenne de tous les essais :							
	Lait concentré 3 fois redilué en moyenne à 1,22			5,3	0,4	5,8	5,3
	Lait concentré en moyenne à 1,35			9,2	0,3	9,5	8,3

Colonnes 1 et 2. La différence relative sur le bilan est obtenue en calculant, pour le poids frais ou pour l'extrait sec, le rapport $\frac{\text{lait} - (\text{fromage} + \text{lactosérum})}{\text{lait}} \times 100$

Colonne 3. Augmentation de rendement due à la concentration du lactosérum.

Colonne 4. Augmentation de rendement due à la rétention des sels phosphocalciques exprimée en phosphate tricalcique (cf. MAUBOIS et *al.*, 1965).

Colonne 5. Augmentation de rendement totale : somme des valeurs des colonnes 3 et 4.

Colonne 6. Augmentation de rendement observée d'après l'analyse des « fromages ».

3° L'effet de rétention des sels phosphocalciques est faible au pH normal du lait (pH 6,6), ainsi que cela a déjà été montré (MAUBOIS et *al.*, 1965). La rétention est en moyenne un peu plus élevée pour le lait concentré 3 fois et redilué (0,4 p. 100) que pour le lait simplement concentré environ 1,3 fois (0,3 p. 100). Mais, compte tenu de la précision des méthodes de dosage, la différence observée ne peut pas être considérée comme significative.

4° Enfin l'augmentation de rendement que l'on peut calculer à partir de l'analyse des laits et des lactosérums est proche de (mais un peu supérieure à) celle qui est effectivement observée.

TABLEAU 3

Proportion de caséine coagulable dans les protéines totales

Numéro des essais	Lait témoin (%)	Lait concentré 3 fois redilué 1,3 (%)	Lait concentré 1,3 (%)
1	72,2	72,3	—
2	73,4	73,4	—
3	72,2	73,4	—
4	69,6	71,1	—
5	73,7	74,0	—
6	73,5	73,2	—
7	70,0	69,8	—
8	74,1	74,3	—
9	71,5	71,3	—
10	75,3	76,9	75,3
11	72,1	74,4	73,1
12	75,9	—	76,3
13	75,5	—	75,6
Différence moyenne par rapport au témoin		+ 0,6	+ 0,4

Dans le cas du lait concentré redilué le rapport entre l'augmentation calculée et l'augmentation observée est égal à 1,09 en moyenne. Dans le cas du lait concentré environ 1,3 fois (sans redilution), le même rapport est égal à 1,14.

L'hypothèse ayant été avancée que l'augmentation de rendement observée sur le « fromage » pourrait provenir de la meilleure coagulation de la caséine du lait concentré, nous avons cherché à vérifier ce point. Le tableau 3 donne l'ensemble des résultats obtenus d'une part avec du lait témoin, d'autre part avec du lait concentré 3 fois puis redilué à 1,3 environ et enfin avec du lait concentré environ 1,3 fois seulement. Les augmentations moyennes de la proportion de caséine coagulée par la présure sont infimes (0,6 p. 100 dans le cas du lait concentré 3 fois redilué, 0,4 p. 100 dans le cas du lait concentré à 1,3 fois seulement). On ne saurait les considérer comme significatives, compte tenu de la précision du dosage (qui comporte une marge d'erreur d'environ 1 p. 100, comme presque tous les dosages biochimiques de ce type) et de la variabilité des résultats qui, tout en demeurant faible, fait apparaître pour quatre échan-

tillons sur treize une proportion de caséine plus forte ou égale dans le lait témoin que dans le lait concentré. Enfin on doit remarquer que l'influence de ces faibles augmentations de caséine coagulable sur l'augmentation de rendement (tabl. 2) serait elle-même très faible (augmentation de rendement de l'ordre de 0,1 p. 100).

DISCUSSION

Les déductions auxquelles nous a conduit le parallèle entre l'éponge immergée dans l'eau salée et le fromage sont donc vérifiées par l'expérience. Les résultats du tableau 2 montrent que, comme on peut le prévoir *a priori*, la concentration du lait augmente le rendement en fromage. Toutefois, l'augmentation observée sur le « fromage » est un peu plus faible que l'augmentation calculée à partir de la composition du lait et du lactosérum : pour une augmentation observée de 5 et de 10 p. 100, l'augmentation calculée atteint respectivement 5,4 p. 100 (1) (5,7 p. 100) et 10,9 p. 100 (1) (11,4 p. 100). La différence entre l'observation et le calcul, tout en demeurant assez réduite, n'est pas entièrement négligeable. On doit noter à cet égard que la valeur adoptée pour la teneur en eau liée de la caséine représente une simplification de faits que nous savons aujourd'hui être plus complexes (Von Hippel et Waugh, 1955). Il est possible qu'un dosage de l'eau liée dans les « fromages » permette d'arriver à une coïncidence encore meilleure entre les résultats observés et calculés.

Il ne semble pas qu'il puisse exister d'autre source d'augmentation du « rendement maigre » provenant notamment d'une meilleure aptitude à la coagulation que présenterait la caséine de lait concentré (Ardebili et *al.*, 1964).

L'augmentation de rendement obtenue en concentrant le lait à un taux de substance sèche égal au triple du taux initial puis en le rediluant à une concentration égale à 1,3 fois celle du lait témoin n'est pas plus élevée que celle obtenue en concentrant le lait 1,3 fois seulement. Donc, seul le degré de concentration final intervient dans l'augmentation du « rendement maigre ».

Enfin les augmentations de rendement (calculées ou observées) dans notre travail sont voisines de celles constatées par d'autres auteurs (Ardebili et *al.*, 1954 ; Anonyme, 1964).

Le taux de concentration du lactosérum étant sensiblement dans le même rapport que celui du lait dont il est issu (2), l'augmentation du « rendement maigre » qui en découle suit la variation du rapport de concentration des laits témoin et concentré. Dans les conditions indiquées, c'est-à-dire pour un « fromage » ayant une teneur en substance sèche égale à 26,8 g pour 100 g de fromage maigre, l'équation (11) de notre étude montre que pour une concentration du lait à un taux de substance sèche égal à 1,1 fois celui du lait témoin, l'augmentation du « rendement maigre » obtenue est de l'ordre de 2,2 p. 100, la teneur en substance sèche du lactosérum témoin étant supposée égale à 65 g par kg. Pour des rapports de concentration

(1) On donne d'abord le chiffre correspondant au lait concentré redilué puis, entre parenthèses, celui correspondant au lait concentré 1,3 fois et non redilué.

(2) Le calcul montre que le taux de concentration du lactosérum est légèrement plus élevé que celui du lait.

des lactosérums témoin et concentré égaux soit à 1,2, soit à 1,3, soit à 1,4, on obtient des augmentations du « rendement maigre » égales respectivement à 4,5 p. 100, 7,0 p. 100 et 9,7 p. 100.

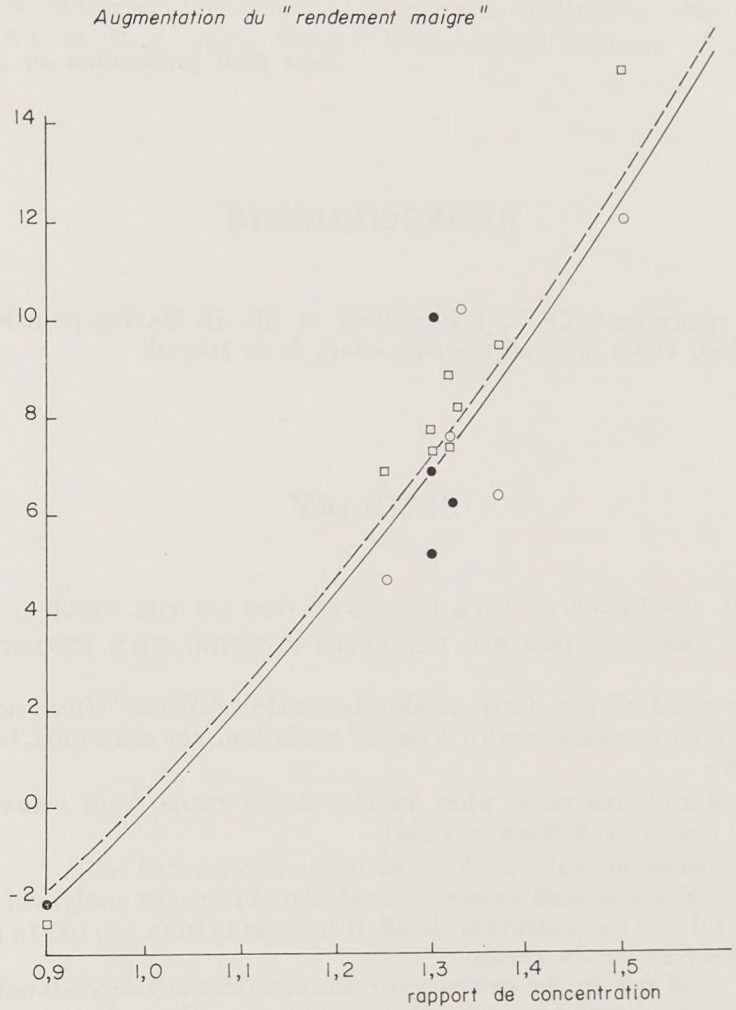


FIG. 1. — *Augmentation du rendement en fonction du rapport de concentration des lactosérums témoin et concentrés*

—— Augmentation du rendement due à la concentration du lactosérum : teneur en substance sèche du lactosérum témoin supposée égale à 65 g par kg.

– – – Augmentation du rendement calculée pour une teneur en substance sèche du lactosérum témoin supposée égale à 65 g par kg et une rétention des sels phosphocalciques telle que l'augmentation de rendement qui en découle soit égale à 0,4 %.

● Augmentation totale du rendement observée au cours des essais : lait concentré 3 fois puis redilué (cf. tab. 2, colonne 6).

○ Augmentation totale du rendement observée au cours des essais : lait concentré environ 1,3 fois cf tab. 2, colonne 6).

□ Augmentation du rendement due à la concentration à laquelle on ajoute (ou de laquelle on retranche) la part revenant aux variations de composition du lactosérum témoin (influence de la composition du lait sécrété par la vache (cf. tabl. 2, colonne 3).

La figure 1 montre que la concordance entre les points représentant une augmentation de rendement observée (o — ●) et ceux représentant l'augmentation de rendement correspondante calculée (□) est assez satisfaisante. Sur cette même figure, les courbes indiquent l'allure générale de la relation existant entre le rapport de

concentration des laits et l'augmentation de rendement calculée (augmentation du rendement due à la concentration du lactosérum et augmentation du rendement totale).

Enfin, il convient de rappeler que les observations rapportées ici ont été faites au pH du lait frais. Elles devront être étendues au cas des pH acides.

Reçu pour publication en septembre 1967.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Dr N.-J. Berridge et Mr. H. Maitre pour les suggestions et les critiques qu'ils ont bien voulu nous adresser au cours de ce travail.

SUMMARY

INFLUENCE OF MILK CONCENTRATION ON THE YIELD OF CHEESE SOLIDS NOT FAT AFTER CLOTTING WITH RENNET

The increase in yield of non fatty solids observed in "cheese" (fresh non acid curd) made from concentrated milk (in comparison with "cheese" made from the same milk, before concentration) has two main sources :

1. the presence of a concentrated whey in the cheese made from concentrated milk (this represents the major source of increase in yield)

2. more calcium phosphate salts in the curd from concentrated milk.

The increase in yield due to both sources was calculated from the analytical data obtained from milk and whey (control and concentrated) ; in all, it represents from 109 to 114 p. 100 of the increased yield actually observed on the cheese.

The increase in yield due to the presence of concentrated whey depends only upon the existing concentration at the time of curd formation. Moreover the hypothesis that casein from concentrated milk would clot more completely than casein from control milk and would thus contribute to the increase in yield could not be confirmed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anonyme, 1964. La fromagerie en continu... révolution, 1964. *Tech. lait.*, **463**, 13-29.

Ardebili G. M., Camus A., Jouzier X., 1964. Étude des rendements obtenus par l'utilisation de lait concentré dans la fabrication des pâtes molles. *Industr. lait.*, **214**, 375-383.

Brevet français, S. E. F. F. A. C. nº 1314931 (1962). *Lait*, **44**, (1964), 213.

Davies D. T., White J. C. D., 1960. The use of ultrafiltration and dialysis in isolating the aqueous phase of milk and in determining the partition of milk constituents between the aqueous and disperse phases. *J. Dairy Res.*, **27**, 171-190.

Jenness R., 1953. Titration of Calcium and Magnesium in milk and milk fractions with ethylene-diamine-tetracetate. *Anal. Chem.*, **25**, 966-968.

Maitre H., 1966. Communication personnelle.

Maubois J-. L., Mocquot G., Blanc-Patin E., 1965. L'influence de la concentration du lait sur le rendement en fromage. *Industr. lait.*, **222**, 309-314.

MAUBOIS J-. L., MOCQUOT G., 1967. Comment ramener à la même teneur en substance sèche des fabrications de fromage en vue de comparer les « rendements » respectifs du lait en fromage. *Rev. lait. franç.* **239**, 15-18.

MOCQUOT G., 1947. Étude sur l'eau liée des fromages. *Lait*, **27**, 576-595.

PYENSON H., DAHLE C. D., 1938. Bound water and its relation to some dairy products. I. The bound water content of some milk products and other products used in the dairy industry. *J. Dairy Sci.*, **21**, 169-185.

RICORDEAU G., MOCQUOT G., 1967. Influence des variations saisonnières de la composition du lait de chèvre sur le rendement en fromage. Conséquences pratiques pour la sélection. *Ann. Zootech.*, **16**, 165-181.

VON HIPPEL P. H., WAUGH D. F., 1955. Casein : Monomers and Polymers. *J. amer. chem. Soc.* **77**, 4311-4319.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (4), 301-308.

CONDITIONS DE PASTEURISATION PERMETTANT D'OBTENIR UN LAIT DE HAUTE QUALITÉ

J. ADDA et G. GROSCLAUDE

Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux, Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas Institut national de la Recherche agronomique

---

Les règlementations définissant les normes officielles de pasteurisation varient légèrement d'un pays à l'autre (1). Dans tous les cas elles définissent la température minimum au-dessus de laquelle doit être porté le lait pour assurer la destruction des organismes pathogènes, mais la plupart de ces règlementations ne précisent pas la température maximum autorisée.

Cependant en pratique, et surtout dans les pays nordiques et anglo-saxons, où le lait est très souvent consommé comme une boisson froide, les industriels ont volontairement limité la température de traitement car le consommateur de lait froid est très sensible au goût de « cuit » provoqué par un chauffage excessif.

Dans notre pays, la teneur élevée en microbes du lait cru a jusqu'à présent incité les professionnels à « pasteuriser » à des températures élevées (égales ou supérieures à 80°C) auxquelles apparaissent des défauts de goût et notamment le goût de « cuit ». Le consommateur français habitué le plus souvent à consommer le lait sous forme de café au lait n'est guère sensible à ces défauts. Mais une lente modification des habitudes alimentaires, résultant à la fois de la propagande en faveur du lait boisson et de la généralisation des réfrigérateurs domestiques, font que le consommateur français accepte aujourd'hui moins volontiers un lait ayant le goût de « cuit », ou plus exactement qu'il est mieux préparé à rechercher un lait n'ayant pas le goût de « cuit ».

D'autre part une disposition légale récente (2) fait obligation aux industriels, désireux de vendre leur produit sous la dénomination de « lait pasteurisé de haute qualité », de ne chauffer le lait qu'à des températures comprises entre 72 et 75°C, températures compatibles avec l'inactivation de la phosphatase alcaline, mais laissant subsister la peroxydase.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant, en dehors de toute considération d'ordre bactériologique, d'essayer de situer les zones de température permettant de respecter ces normes de pasteurisation, en contrôlant les réactions aux épreuves de la phosphatase et de la peroxydase pour diverses combinaisons de température et de temps de chambrage.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pasteurisation

Nos essais ont été effectués sur un Pasteurisateur à plaques à chambreurs tubulaires verticaux (APV-type HX) sur lequel le thermomètre de contrôle situé à la sortie de l'échangeur thermique avait été remplacé par un thermocouple associé à un enregistreur Graphispot permettant d'apprécier des variations de 0,3°C. Dans tous nos essais, le débit fixé à 3 000 l/h permettait d'obtenir des temps de chambrage variant de 15 à 60 secondes environ en fonction du nombre d'éléments de chambrage (tabl. 1).

TABLEAU I

Évolution du temps de chambrage en fonction du nombre d'éléments de chambrage
(pour un débit de 3 000 l/h)

Nombre d'éléments de chambrage	Durée minimum (1) de chambrage (en secondes)	Durée moyenne (1) de chambrage (en secondes)
1	10,5	15,5
2	23	30
3	35	45
4	48	60

(1) Pour un débit de 3 000 l/h le lait traverse la section de chauffage en 2,6 secondes. A l'intérieur de cette section le lait se réchauffe rapidement et atteint la température de pasteurisation. A partir de ce moment et jusqu'à ce que le lait sorte de la section de chauffage il y a donc un début de chambrage dont la durée, indéterminée mais inférieure à 2,6 secondes est à ajouter à celle indiquée par le constructeur.

De plus l'élément de chauffage est relié au premier chambreur par une canalisation d'environ 1 mètre de long, ce qui pour un débit constant accroît le temps de chambrage de 2,2 secondes.

Au total il faut donc ajouter au temps de chambrage un temps compris entre 2,2 secondes minimum et 4,8 secondes au maximum.

Contrôle indirect du degré de chauffage.

1° *Par l'épreuve de la phosphatase.*

Nous avons utilisé la méthode de KOSIKOWSKI (3). Celle-ci, n'étant pas à notre connaissance, couramment utilisée en France à ce jour, nous en donnons ci-dessous la description détaillée.

Elle consiste à incuber dans un boyau de dialyse le lait soumis au test en présence d'un substrat tamponné. Au cours de l'incubation le phényl phosphate disodique libère du phénol qui migre au travers de la membrane cellulosique vers une solution de sulfate de cuivre où il est dosé ultérieurement par colorimétrie au 2-6 dibromoquinone chloroïmine (BQC).

Toutes les protéines qui perturbent le dosage et qui doivent, dans les méthodes classiques, être éliminées par défécation, sont retenues par la membrane ce qui rend l'épreuve extrêmement facile à réaliser.

Réactifs.

— Substrat tamponné au phényl phosphate disodique.

Dissoudre 11,5 g de carbonate de sodium anhydre, 10,2 g de bicarbonate de sodium et 1,1 g de phényl phosphate disodique dans l'eau distillée et amener à 1 litre.

— Solution de sulfate de cuivre.

Dissoudre 0,1 g de SO_4Cu, 5 H_2O dans l'eau distillée et amener à 1 litre.

— BQC.

Dissoudre 0,2 g de 2,6 dibroquinone chloroïmine (BQC) cristallisée dans 25 ml d'alcool éthylique ou d'alcool méthylique absolu.

— Boyau de dialyse (Visking n° 27).

Appareillage.

— Tubes 25 × 120.
— Bain-marie 37°C ± 1°C.
— Électrophotomètre Beckman B.

Mode opératoire.

Couper le boyau de dialyse en segments de 20 cm environ et, après l'avoir fait tremper 30 secondes dans l'eau distillée, faire un nœud serré à l'une des extrémités. Pipetter 5 ml de lait et 10 ml de substrat dans le boyau et le fermer par un nœud. Introduire le boyau dans un large tube contenant 10 ml de SO_4Cu, puis incuber 1 heure à 37°C.

Colorimétrie.

Retirer le boyau de dialyse, ajouter à la solution de sulfate de cuivre 2 gouttes de la solution BQC et agiter par retournement, laisser la couleur bleue se développer pendant 5 mn à 37°C, puis ajouter 5 ml de butanol primaire et extraire la coloration en retournant 5 fois le tube. Lire la densité optique à 650 mμ par rapport à un blanc effectué dans les mêmes conditions en substituant du lait bouilli au lait à examiner.

Étalonnage.

Préparer une solution tampon en dissolvant 11,5 g de CO_3Na_2, 10,2 g de CO_3HNa et 0,1 g de SO_4Cu dans 1 litre d'eau.

Préparer une solution à 4 μg de phénol par ml en diluant à 500 ml deux ml d'une solution de phénol à 1 g/l fraîchement préparée avec cette solution tampon.

Mélanger ces 2 solutions dans les proportions indiquées dans le tableau 2, puis réaliser un dosage colorimétrique du phénol comme précédemment indiqué.

TABLEAU 2

Établissement d'une courbe étalon pour le dosage de la phosphatase

Tampon plus (ml)	Solution phénol contenant 4 μg (ml)	μg phénol dans 10 ml
10	0	0
9,75	0,25	1
9,5	0,5	2
9	1	4
8	2	8
7	3	12
6	4	16
5	5	20
0	10	40

On considère qu'un lait est correctement pasteurisé quand la quantité de phénol libéré ne dépasse pas 1 μg pour 5 ml de lait.

Cette méthode permet de déceler 0,1 pour 100 de lait cru additionné à du lait pasteurisé.

2° *Par l'épreuve de la peroxydase.*

Nous avons utilisé le test de STORCH (4).

Principe.

La peroxydase décompose l'eau oxygénée en libérant de l'oxygène qui se fixe sur la p. phénylène diamine dont la forme réduite est fortement colorée.

Cette méthode ne diffère de celle décrite en annexe de l'arrêté portant description de méthodes d'analyse en vue du contrôle de la qualité des laits (5) que par la nature de la substance oxydable utilisée. La substitution de la p. phénylène diamine au gaïacol, augmente la sensibilité de la réaction et permet ainsi dans une étude de ce genre de mieux préciser les limites de la zone d'inactivation de la peroxydase, sans toutefois conduire à des résultats différents de ceux obtenus par la méthode au gaïacol.

Réactifs.

Tampon. Dissoudre 86,5 g de phosphate disodique (PO_4HNa_2, 2 H_2O) et 1,3 g d'acide citrique dans l'eau distillée et ajuster à 1 litre.

Solution de dichlorhydrate de paraphénylène diamine. Dissoudre 2 g de cristaux dans l'eau distillée et amener à 100 ml (à conserver au froid dans un flacon ambré).

Solution diluée d'eau oxygénée à 0,5 p. 100 H_2O_2.

Matériel.

Bain-marie à 35°C.

Mode opératoire.

Introduire dans un tube à essai 5 ml de lait à examiner. Ajouter 2,5 ml du tampon. Porter au bain-marie et lorsque le contenu du tube atteint 35°C ajouter 6 gouttes de la solution d'eau oxygénée. Agiter puis ajouter 2 gouttes de la solution de paraphénylène diamine. Remettre le tube au bain-marie. La réaction est considérée comme positive si, après 30 secondes, il apparaît sans équivoque possible une coloration bleue par comparaison avec celle d'un tube témoin, contenant 5 ml de lait bouilli et ayant subi le même traitement.

Nous avons essayé d'estimer le début de l'inactivation de la peroxydase en soumettant au test décrit ci-dessus 5 ml d'une dilution au 1/20 du lait à examiner dans du lait bouilli et en considérant qu'il y avait un début d'inactivation lorsque cette dilution donnait une réaction négative alors qu'elle était encore positive avec le lait non dilué. La réaction est alors notée ±.

RÉSULTATS

Les résultats des différents essais (tabl. 3 et fig. 1) permettent de distinguer plusieurs zones de température, dont les limites varient en fonction du temps de chambrage.

Dans une première zone, dont la limite supérieure est de 72°C pour un temps de chambrage moyen de 15 secondes, les réactions aux tests de la phosphatase et de la peroxydase sont toutes deux positives.

En augmentant la température on atteint la zone de pasteurisation (H. T. S. T.) dans laquelle la phosphatase est inactivée tandis que la peroxydase est encore intacte. Pour un temps de chambrage de 15 secondes [1], cette zone est comprise entre 72° et 75°C. Pour un temps de chambrage supérieur à 30 secondes [1], la limite inférieure de température pour laquelle la réaction de la phosphatase demeure négative est de 70°C, mais une telle température n'est pas considérée comme une température de

[1] Temps de chambrage moyen.

TABLEAU 3

Résultats

Essai n° 1

Nombre d'éléments de chambrage ↓ / Température → °C	69	70	71	72	73
1	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+ (+)	— (+)
2	+ (+)	+ (+)	— (+)	— (+)	— (+)
3	+ (+)	— (+)	— (+)	— (+)	— (+)
4	+ (+)	— (+)	— (+)	— (+)	— (+)

Essai n° 2

Nombre d'éléments de chambrage ↓ / Température → °C	71	72	76,5	78,5	81
1	+ (+)	— (+)	— (+)	— (±)	— (—)
2	— (+)	— (+)	— (±)	— (—)	— (—)
3	— (+)	— (+)	— (±)	— (—)	— (—)
4	— (+)	— (+)	— (±)	— (—)	— (—)

— phosphatase négative (—) peroxydase négative
+ phosphatase positive (+) peroxydase positive
(±) peroxydase partiellement inactivée.

TABLEAU 3 (*suite*)

Essai n° 3

Nombre d'éléments de chambrage ↓ / Température → °C	71	73	74	76	81
1	+ (+)	— (+)	— (+)	— (+)	— (—)
2	— (+)	— (+)	— (+)	— (+)	— (—)
3	— (+)	— (+)	—	— (±)	— (—)
4	— (+)	— (+)	—	— (±)	— (—)

Essai n° 4

Nombre d'éléments de chambrage ↓ / Température → °C	75	77	78	79	80
1	— (±)	— (±)	— (±)	— (±)	— (±)
2	— (±)	— (±)	— (±)	— (—)	— (—)
3	— (±)	— (±)	— (±)	— (—)	— (—)
4	— (±)	— (±)	— (—)	— (—)	— (—)

— phosphatase négative (—) peroxydase négative
+ phosphatase positive (+) peroxydase positive
(±) peroxydase partiellement inactivée.

pasteurisation H. T. S. T.. A une température supérieure à 75°C on entre dans la zone de destruction partielle de la peroxydase. La destruction totale de cet enzyme est observée à 80°C pour un temps de chambrage de 15 secondes (1) et de 77°C pour un temps de chambrage de 60 secondes (1).

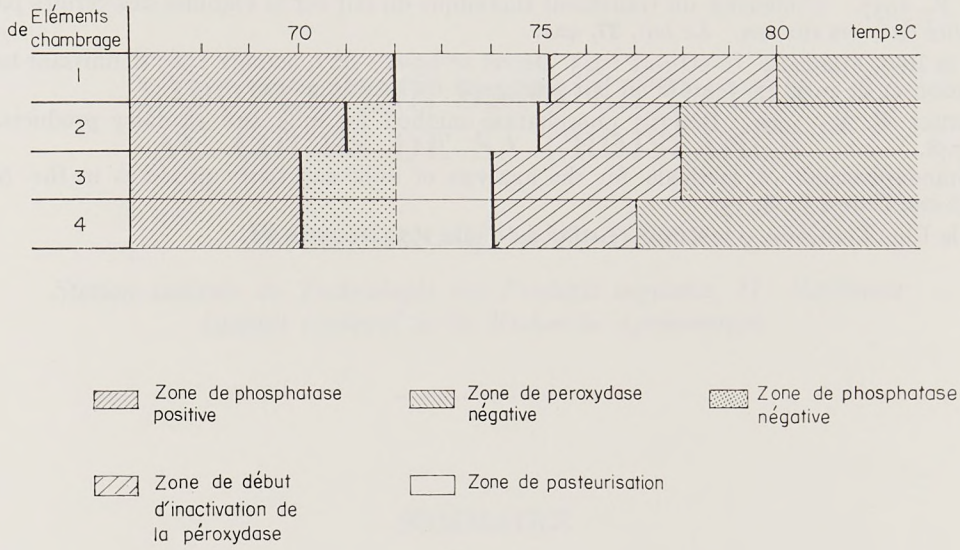


FIG. 1.

Compte tenu de ces résultats il apparaît donc recommandé de choisir à l'intérieur de la zone de pasteurisation, une température qui, provoquant la destruction de la phosphatase, apporte la garantie nécessaire sur le plan de l'hygiène et, respectant la peroxydase, témoigne que le chauffage n'a pas été excessif et que le goût de « cuit », n'est pas à redouter. La température ne devra toutefois pas descendre au-dessous de 72°C afin de respecter les normes de pasteurisation H. T. S. T.. Il paraît par contre possible de tolérer des températures situées un peu au-delà de la limite supérieure de la zone de pasteurisation, encore qu'il ne faille pas trop se rapprocher des conditions entraînant une destruction marquée de la peroxydase. Il est indispensable en effet que la réaction de la peroxydase demeure positive, dans les conditions de travail qui ont été décrites plus haut.

Il faut en outre souligner que de telles conditions de température ne permettent d'obtenir un produit vraiment satisfaisant, au point de vue de ses caractères organoleptiques et de sa qualité de conservation, que si le lait cru est de bonne qualité bactériologique.

Reçu pour publication en décembre 1967.

SUMMARY

PASTEURIZATION STANDARDS FOR « HIGH QUALITY PASTEURIZED MILK. »

Various HTST pasteurization conditions were studied in order to obtain more information on pasteurization standards for « high quality pasteurized milk ».

Phosphatase and peroxidase inactivation temperatures are indicated for various holding times. Phosphatase can be inactivated while peroxidase is still active on heating milk at 162-167 F for 15 seconds.

(1) Temps de chambrage moyen.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) KÄSTLI P., 1957. L'influence du traitement thermique du lait sur la viabilité des germes pathogènes et sur l'activité de leurs toxines. *Le lait*, **37**, 404.

(2) J. O. de la Rép. Française. 10 octobre 1965. Décret n° 65-862 du 9 octobre 1965 définissant les conditions de production et de mise en vente d'un lait pasteurisé de haute qualité.

(3) KOSIKOWSKI F. V., 1964. Dialysis phosphatase method for milk and all dairy products. *J. Dairy Sci.*, **47**, 748.

(4) 1954. Standardisation of methods for the analysis of milk and dairy products in the Netherlands. *Neth. Milk and Dairy, J.*, **8**, 137.

(5) J. O. de la Rép. Française. 9 juin 1955. Arrêté du 2 juin 1955. Annexe VI.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (4), 309-.320

RIBOFLAVINE DANS LE RAISIN AU COURS DE SA CROISSANCE

Andrée OURNAC, Marcelle DÉCOR

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

La teneur en riboflavine a été déterminée dans le raisin depuis la formation du fruit jusqu'à la maturation.

Son évolution est étudiée surtout dans le contexte physiologique de la maturation du Raisin.

Les dosages sont effectués séparément sur le fruit entier et sur le jus.

Les acides totaux ainsi que les sucres sont évalués parallèlement.

INTRODUCTION

La riboflavine dans le raisin n'a pas donné lieu à de nombreuses recherches, car on a très vite considéré ce fruit comme étant une mauvaise source de vitamine B_2.

Mme RANDOIN, dès 1928, écrivait pourtant que le jus de raisin frais, utilisé immédiatement après pression des grappes, renferme de la vitamine C, de notables proportions de vitamine B d'utilisation nutritive, mais ne renferme que peu de vitamine B antinévritique.

MORGAN et *al.* (1939), PERLMAN et MORGAN (1945), CASTOR (1953), HALL et *al.* (1956), nous renseignent sur les quantités de riboflavine trouvées dans un certain nombre de variétés de raisins et dans leur jus, elles diffèrent assez sensiblement entre elles.

FLAVIER (1939), puis PEYNAUD et LAFOURCADE (1958), déterminent l'évolution de la riboflavine dans le raisin au cours de la maturation. Pour ces derniers la teneur du jus passe par un maximum un mois avant la maturité. Dans le moût de raisins mûrs, la teneur en riboflavine varie de 3 à 60 µg par litre.

Il nous a paru intéressant de reprendre l'étude des variations que subit la teneur du raisin en riboflavine au cours de son évolution, en considérant ce corps, non comme une vitamine nécessaire à l'homme, mais comme un facteur participant aux métabolismes qui se produisent pendant la croissance et la maturation du fruit.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Les cépages considérés sont les suivants : *Terret blanc*, *Aramon*, *Carignan rouge* et *Morastel*, du Domaine de Pech-Rouge, près Narbonne (Domaine expérimental I. N. R. A.). Nous avons ainsi étudié des Raisins rouges et des Raisins blancs.

Les raisins étaient prélevés tous les 8 jours, le matin, pendant la période s'étendant du 12 juillet

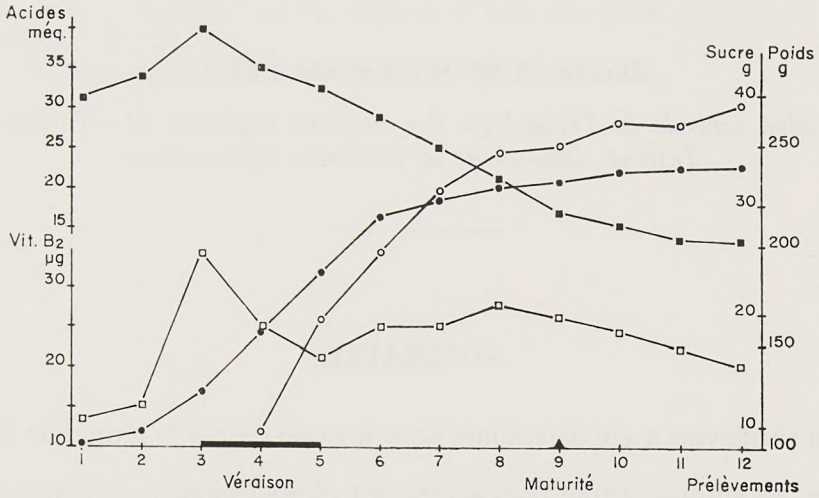


FIG. 1. — Carignan : *Teneurs par 100 grains*

■——■ Acides
□——□ Vitamines B_2
○——○ Sucres
●——● Poids

au 26 septembre. On détachait par cisellement, sur chaque cep, 3 ou 4 fragments de grappe de 4 ou 5 baies chacun. On disposait ainsi pour chaque cépage de 800 à 1 000 grains qui étaient répartis en 8 à 10 lots de 100 grains chacun, égalisés en poids. Un lot servait au dosage de la vitamine totale de 100 baies, un autre au dosage de la vitamine du jus seul après broyage et centrifugation. La différence représente la teneur des constituants solides du fruit : pellicule + pulpe.

On déterminait, en outre, sur le jus, les sucres par réfractométrie et l'acidité totale par la soude N/10 avec le rouge de phénol comme indicateur de fin de réaction.

L'évolution de la composition du fruit (poids de 100 grains, acidité totale, glucides) figure sur le tableau 1 et la figure 1.

Détermination de la riboflavine

La riboflavine est déterminée par fluorométrie. La technique de dosage utilisée est inspirée des méthodes exposées par CONNER et STRAUB., 1941, HOFFER et *al.*, 1944, *The Association of vitamin chemists*, 1947, 1966 et KEVEI et *al.*, 1954. Voici comment sont réalisées les quatre opérations essentielles du dosage, qui, la riboflavine se détruisant à la lumière, doivent être effectuées dans la pénombre.

1° *Extration.*

La riboflavine se trouve dans les tissus végétaux en grande partie sous forme d'ester phosphorique et combinée à une protéine spécifique, identifiée dans très peu de cas, une double hydrolyse est alors nécessaire à son obtention sous forme libre et à son dosage, la forme libre seule étant adsorbée sur Florisil.

Une première hydrolyse acide la libère de la protéine et une deuxième hydrolyse enzymatique, au moyen d'une phosphatase, assure sa déphosphorylation. Ce double traitement a dû être obligatoirement effectué sur les constituants solides et sur le jus lui-même. On a vérifié que dans le jus la riboflavine ne se trouve en totalité, ni sous forme libre, ni sous forme d'ester phosphorique, une partie se trouve liée à des protéines.

TABLEAU I

Évolution de la composition du fruit

Date des prélèvements	12-7	18-7	25-7	1-8	8-8	16-8	22-8	29-8	5-9	12-9	19-9	26-9
Terret												
Poids de 100 grains en g	99	113	122	134	178	240	264	288	300	305	318	333
Acidité totale en méq/l	412,5	452,5	502,5	495	318	217,5	161	128	115	93	91	80
Acidité totale en méq/100 grains	25,3	36,2	41,2	44,6	42,1	37,8	31,6	27,4	24,2	20,1	20,4	18,4
Sucres en g/litre					102	126,4	154	168,5	186	194	204	215
Sucres en g/100 grains					13,5	22	30,2	36	39	42	45,7	49,5
Aramon												
Poids de 100 grains en g	163	186	220	280	320	360	381	396	380	393	390	387
Acidité totale en méq/l	425	460	422,5	297,5	210	150	126	106	98	87	85	80
Acidité totale en méq/100 grains	44,6	58,9	62,5	57,7	50,8	42	36,8	31,8	28,1	24,5	23,4	22
Sucres en g/l				98	126,4	153	165	175	193	202	213	222
Sucres en g/100 grains				19	30,6	42,8	48,2	52,5	55,4	58,7	58,7	61
Carignan												
Poids de 100 grains en g	100	106	128	156	188	215	222	230	232	239	233	236
Acidité totale en méq/l	425	457,5	472,5	370	255	190	150	120	108	90	85	82
Acidité totale en méq/100 grains	32,1	33,4	40,2	34,8	35,7	30,6	24,3	21,1	17,3	15,1	13,3	13,1
Sucres en g/l				98	138	167	192	197	218	226	238	247
Sucres en g/100 grains				9,2	19,3	26	31	34,7	35	38	37	39,5
Morastel												
Poids de 100 grains en g	121	131	154	177	211	254	253	266	260	263	258	242
Acidité totale en méq/l	420	452,5	490	455	343	255	211	166	151	136	127	116
Acidité totale en méq/100 grains	34,7	42,5	48,5	51	51,5	47,9	39,7	32,2	26,9	24,2	21	18,2
Sucres en g/l					101	124	148	162	178	186	197	200
Sucres en g/100 grains					15,2	23,3	27,8	31,4	31,7	33	32,5	31,5

A mesure que la maturité approche, la proportion de vitamine ainsi liée diminue sans disparaître totalement.

L'hydrolyse acide est réalisée par un séjour d'une heure au B. M. bouillant en présence de SO_2H_4 N/10 : d'une part, du lot de 100 baies broyées au mixer, d'autre part, d'un certain volume de jus. Le liquide de centrifugation pour les baies et le jus acidifié sont ensuite ramenés à pH = 4,5-5 au moyen d'acétate de Na 2,5 N et laissés à digérer 2 heures à 45-50° après addition d'un certain poids de mylase P.

2° *Oxydation.*

Une oxydation permanganique ménagée permet, sans toucher à la riboflavine, l'élimination de certains pigments pouvant interférer au cours de la mesure fluorométrique. Pour cela, le temps d'action du permanganate doit être court (30 secondes à 1 minute) et l'excès détruit rapidement par H_2O_2. La quantité de permanganate à utiliser est délicate à déterminer et doit pourtant être fixée avec précision.

Pour sa détermination on utilise le test suivant :

200 cc d'eau + 2 cc SO_4H_2 pur + 10 à 20 cc de la solution à doser sont additionnés de MnO_4K à 3 ou 6 p. 100 versé goutte à goutte jusqu'à ce que la coloration rose persiste au moins 1 minute, le volume de permanganate obtenu sera celui à utiliser pour le dosage.

3° *Purification.*

Elle est réalisée par adsorption sur Florisil et élution par une solution chaude d'acétone à 80 p. 100. Le Florisil calibré entre 60 et 80 mesh (diamètre compris entre 0,175 mm et 0,246 mm), lavé à l'acide acétique à 2 p. 100 est placé dans une colonne en forme de tulipe ; on pose sur le sommet du Florisil un peu de laine de verre pour briser les bulles d'oxygène provenant du traitement à l'H_2O_2 ; l'écoulement de la solution précédemment oxydée doit être lent.

4° *Mesure fluorométrique.*

Tout d'abord on évalue la fluorescence émise par l'éluat acétonique irradié à 4 400 Å. Ensuite le pH de cet éluat est porté à 11 (pH auquel la riboflavine ne donne pas de fluorescence), par addition d'une goutte de soude concentrée (10 g/litre) dans la cuve même du spectrophotomètre, la nouvelle lecture constitue le témoin à soustraire de la première. Le spectrophotomètre est réglé au moyen d'une solution de fluorescéine. Les opérations d'adsorption et d'élution sont réalisées simultanément sur une solution de riboflavine pure ainsi que de mylase P à pH 4,5-5, la mylase P renfermant généralement une certaine dose de riboflavine que l'on doit déterminer.

RÉSULTATS

Teneurs par 100 grains (tabl. 2)

Fruit entier (fig. 2).

La teneur en riboflavine de 100 baies varie de 13 à 40 µg pour les cépages considérés ; au cours du développement du fruit, elle est de 20 à 30 µg pour le fruit mûr. Cette teneur augmente rapidement pendant la période herbacée et diminue dès le début de la véraison.

La diminution se poursuit rapidement pendant la véraison et plus lentement dans les grains vérés, une stabilisation ou même une légère augmentation pouvant aussi se produire. Mais dès que le stade de maturité est atteint la chute de la teneur en riboflavine s'accentue.

Constituants solides (*pellicule + pulpe*) (fig. 3).

Leur teneur varie de 10 à 35 µg et évolue de la même façon que celle du grain entier : augmentation rapide avant la véraison, puis diminution.

TABLEAU 2

µg de vitamine B_2 par 100 baies

	1er	2e	3e	4e	5e	6e	7e	8e	9e	10o	11e	12e
Terret												
Fruit entier	18	21	40	32	25	27	25	22	25	23	23	21
Jus	1,5	3,7	4,7	4,8	7	10,8	11	13,7	12	6,5	8,7	10
Pellicule + Pulpe	16,5	17,3	35,3	27,2	18	16,2	14	8,3	13	16,5	14,3	11
Aramon												
Fruit entier	17	19	38	23	23	28	26	28	33	32	31	24
Jus	2,8	4,7	7,7	8,7	9,7	17,4	17,5	21	18	12,7	13,7	12
Pellicule + pulpe	14,2	14,3	30,3	14,3	13,3	10,6	8,5	7	15	19,3	17,3	12
Carignan												
Fruit entier	13	15	34	25	21	25	25	27	26	24	22	20
Jus	2,3	2,4	4,4	3,8	4,2	8,6	10,4	9,5	10,5	8	7	7
Pellicule + pulpe	10,7	12,6	29,6	21,2	16,8	16,4	14,6	17,5	15,5	16	15	13
Morastel												
Fruit entier	14	18	38	22	28	24	25	22	22	21	19	12
Jus	2	3	4,5	4,6	6,3	10	9	6,8	11	8	6,8	6,4
Pellicule + pulpe	12	15	33,5	17,4	21,7	14	16	15,2	11	13	12,2	5,6

Jus (fig. 3).

La richesse en vitamine B_2 du jus issu de 100 baies est relativement faible : 1,5 à 20 µg. Elle augmente continuellement et lentement tout au cours du grossissement du grain, plus rapidement après la véraison, atteint son maximum aux environs de la maturité, puis diminue.

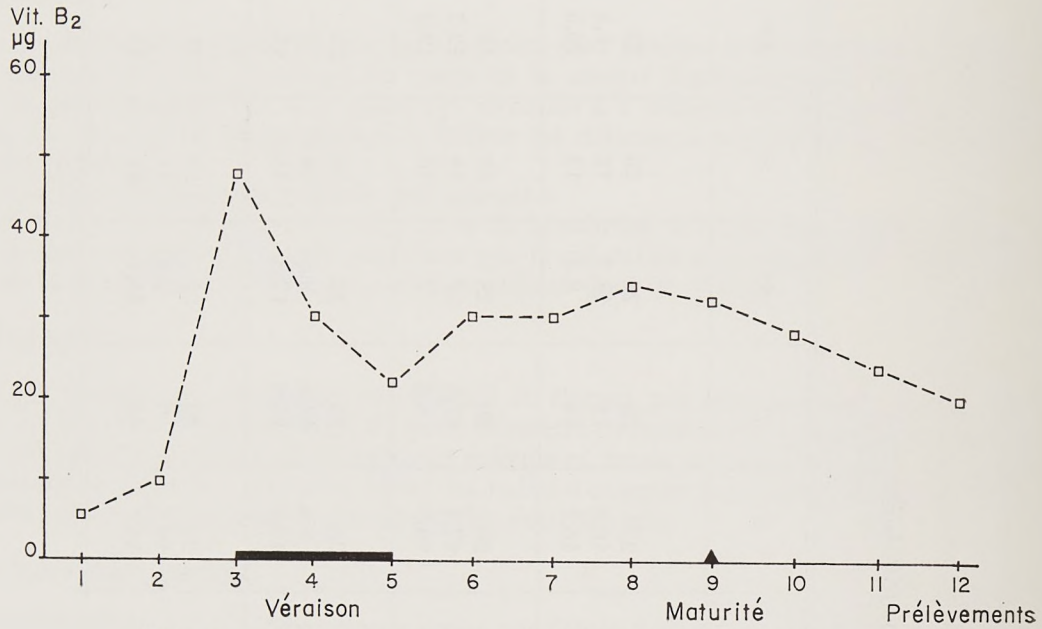


FIG. 2. — Carignan : *Vitamine B_2 dans 100 grains entiers*

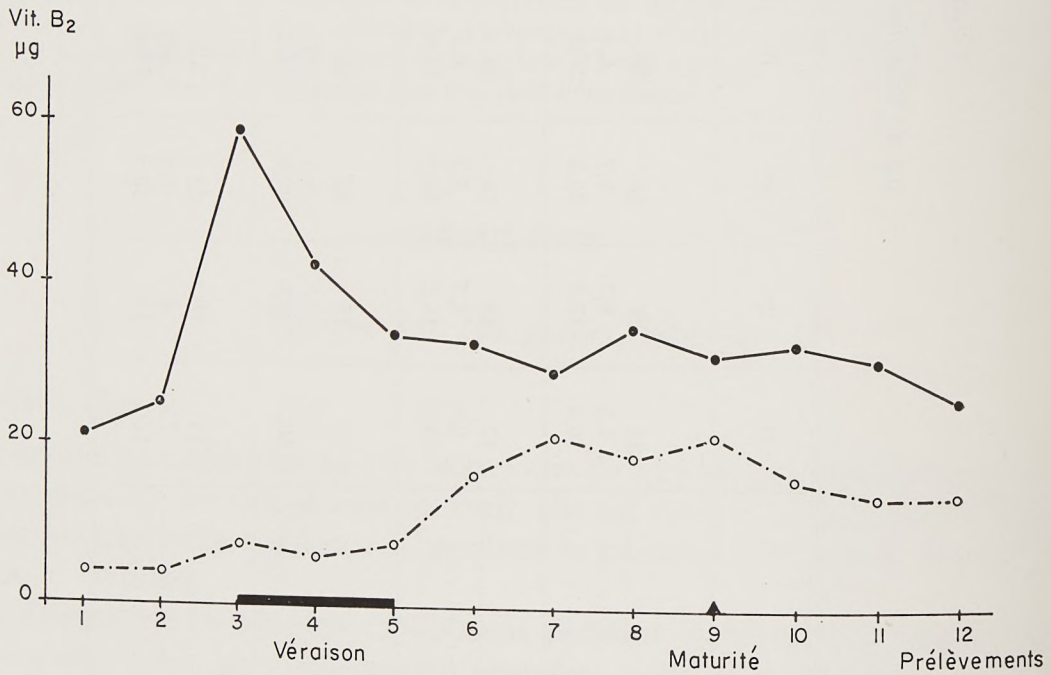


FIG. 3. — *Vitamine B_2 par 100 grains*

○———○ Jus

●—·—·—● Pellicules + pulpe

La teneur en riboflavine atteint son maximum à la véraison pour les constituants solides et à la maturité pour le jus.

La riboflavine qui augmente continuellement dans le jus jusqu'à la maturité,

alors qu'elle diminue dans les constituants solides dès la véraison, semble évoluer au cours de la croissance du fruit vers une forme soluble.

Dans le raisin mûr, la vitamine est répartie de la façon suivante : $\frac{1}{2}$ à $\frac{1}{3}$ dans le jus, $\frac{1}{2}$ à $\frac{2}{3}$ dans les pellicules.

Teneur par 100 grammes (tabl. 3)

Fruit entier.

Cent grammes de fruit renferment en moyenne une dizaine de µg de riboflavine pendant la période herbacée, cette teneur augmente ensuite jusqu'à la véraison pour atteindre son maximum, 36 µg, dès le début de celle-ci, puis diminue. Aux environs de la maturité une certaine stabilisation peut se produire avant la chute correspondant à la surmaturation.

La richesse d'un kilo de fruit mûr voisine 100 µg, de sorte qu'au stade consommation, un kilo de raisin ne contribue que faiblement à couvrir les besoins quotidiens de l'homme, qui sont fixés à 2 mg, son apport représente $\frac{1}{20}$ de la ration.

Constituants solides et jus (fig. 4).

Les constituants solides sont beaucoup plus riches en valeur absolue en riboflavine que le jus, et cela tout au long de la croissance du fruit. Alors que la teneur de 100 g évolue entre 1,5 et 6 µg, celle de 100 g de pulpe + pellicule varie entre 10 et 100 µg.

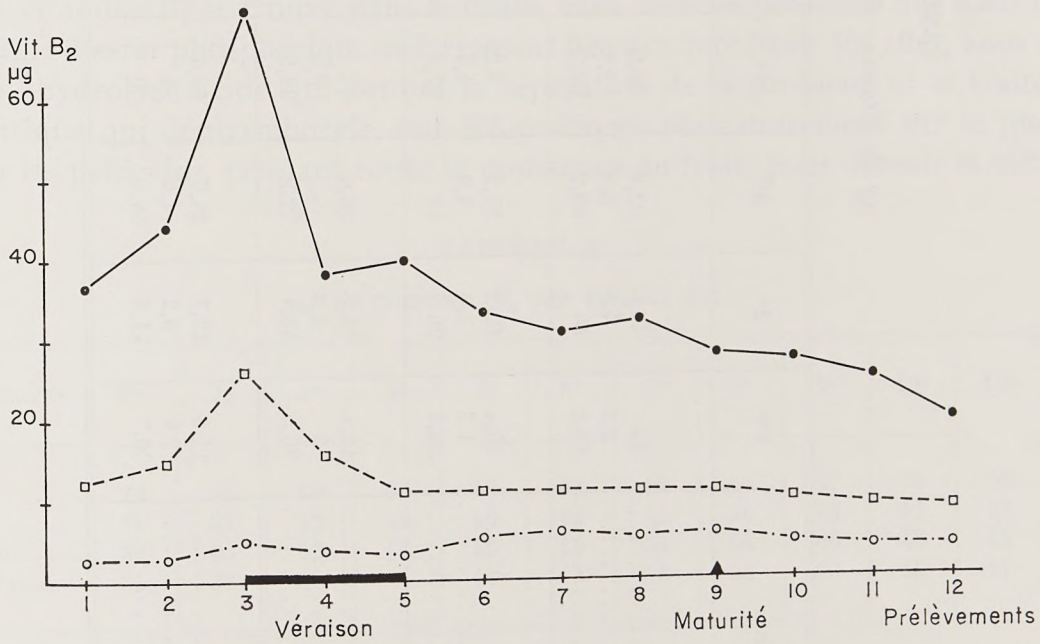


FIG. 4. — Carignan : *Vitamine B_2 par 100 grammes*
□———□ Fruit entier
●———● Pellicules + pulpe
○—·—·—○ Jus

Cependant, à la maturité, l'écart entre ces teneurs s'atténue, étant donné qu'à cette époque de la croissance, la richesse du jus est maximum alors que celle des constituants solides a bien diminué depuis son maximum.

TABLEAU 3

µg de vitamine B_2 par 100 grammes

Prélèvements	1es	2e	3e	4e	5e	6e	7e	8e	9e	10e	11e	12e
Terret												
Fruit entier	18	18,6	32,8	23,9	14	11,3	9,5	7,6	8,3	7,5	7,3	6,3
Jus	2,2	4,5	5,8	5,2	5	5,7	5,3	6	5,3	2,8	2,6	4
Pellicule + pulpe	53,2	54	88,2	63,2	46	31	25,5	14	18	23	19	13,3
Aramon												
Fruit entier	10,4	10,2	17,3	8,2	7,2	7,8	6,8	7	8,7	8,1	8	6,2
Jus	1,7	3,6	4,9	4,4	3,8	5,9	5,6	6,5	5,9	4	4,6	4
Pellicule + pulpe	24,5	26	48	17,8	20,7	16	12	9,6	20,5	23,5	18,8	13,7
Carignan												
Fruit entier	12,4	14,7	26,6	16	11,2	11,6	11,3	11,3	11,2	10	9,4	8,5
Jus	3	3,3	5	3,8	2,8	5,2	6	5,1	6	4,5	4,1	4
Pellicule + pulpe	36,8	43,4	72,2	38,5	43	33,4	31	35	28	27	25	20,6
Morastel												
Fruit entier	11,6	13,7	24,7	12,4	13,2	9,5	9,9	8,3	8,5	8	7,4	5
Jus	2,4	3,2	4,4	4	4,1	5	4,5	3,3	5,6	4,2	3,8	3,7
Pellicule + pulpe	30,7	41,6	64,4	29	39,4	24,5	28,5	24,9	17	16,5	15,5	7,9

Teneur du litre de jus (tabl. 4, fig. 5).

La teneur du litre de jus de raisin passe par deux maximums, le premier au début de la véraison, le deuxième, plus élevé, à la maturité. Un litre de jus de raisin mûr renferme 60 à 70 µg, dose relativement faible par rapport aux besoins humains.

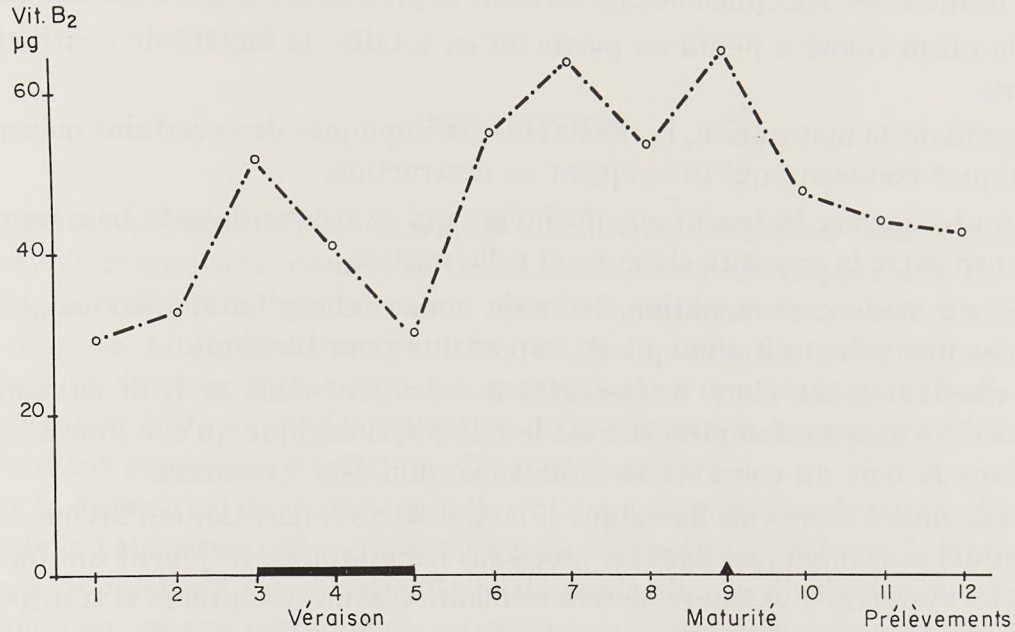


FIG. 5. — Carignan : *Vitamine B_2 par litre de jus*

Forme de la vitamine dans le raisin.

La vitamine B_2 se trouve dans le raisin, tant dans les pellicules que dans le jus, sous forme d'ester phosphorique et fortement liée aux protéines. En effet, nous avons vu que l'hydrolyse acide qui permet la séparation de la protéine, et le traitement enzymatique qui déphosphoryle, ont été pratiqués obligatoirement sur le jus ainsi que sur les pellicules, pendant toute la croissance du fruit, pour obtenir la vitamine totale.

TABLEAU 4

µg de vitamine B_2 par litre de jus

Prélèvements	1er	2e	3e	4e	5e	6e	7e	8e	9e	10e	11e	12e
Terret	22	46	58	53	53	62	56	64	57	30	39	43
Aramon	27	37	52	45	40	62	60	70	63	45	50	43
Carignan	30	33	52	41	30	55	64	54	66	48	45	43
Morastel	25	33	46	41	42	53	48	35	63	45	41	41

DISCUSSION

On sait que la riboflavine est un corps universellement répandu ; on imagine difficilement une cellule qui en soit dépourvue ; on sait aussi que, comme c'est le cas de toutes les vitamines hydrosolubles du complexe B, elle est synthétisée par les

feuilles vertes (GOODWIN, 1963), ceci pourrait expliquer que le raisin vert, qui renferme de la chlorophylle et qui fonctionne jusqu'à sa coloration comme une feuille, élabore de la riboflavine pendant cette période.

Dès que la baie se colore, on assiste à une diminution de sa teneur en riboflavine qui peut résulter des deux phénomènes suivants se produisant seuls ou simultanément :

— le raisin coloré a perdu en partie ou en totalité la faculté de synthétiser la riboflavine,

— pendant la maturation, la riboflavine est impliquée dans certains mécanismes enzymatiques nouveaux qui provoquent sa destruction.

De toutes façons, la teneur en riboflavine qui se trouve dans la baie représente la différence entre la quantité élaborée et celle utilisée.

Mais, au stade consommation, le raisin a une teneur en riboflavine qui ne lui confère pas une valeur vitaminique B_2 importante pour l'homme.

La riboflavine est alors intéressante à considérer dans ce fruit en tant que coenzyme d'un enzyme complet, et c'est le rôle physiologique qu'elle joue sous cette forme, dans la baie au cours de sa croissance qu'il faut examiner.

Les enzymes à coenzyme flavinique (Flavine Mono Nucléotide et Flavine Adenine Dinucléotide) sont impliqués dans les processus respiratoires, ils jouent un rôle essentiel dans les systèmes d'oxydo-réduction cellulaire comme accepteurs et transporteurs d'hydrogène. En particulier, leur action est liée aux enzymes à coenzyme pyridinique et au système des cytochromes.

Il est donc très probable que la riboflavine joue un rôle dans la respiration du raisin et que son évolution est en relation avec celle de l'intensité respiratoire du fruit.

D'après les résultats de GERBER (1897) exposés et commentés par GENEVOIS et ceux de GENEVOIS lui-même (1938) l'intensité respiratoire rapportée à une baie croît, la quantité de ferment respiratoire va en augmentant, pendant toute la période de formation de la baie par multiplication cellulaire, elle reste à peu près constante ou diminue lorsque les cellules croissent en volume sans croître en nombre.

ULRICH (1952) expliquant les variations de l'intensité respiratoire des fruits dans le temps, émet l'hypothèse que la montée vers le summum respiratoire pourrait être attribuée, entre autres, à un accroissement d'activité enzymatique d'origine inconnue, tandis que la chute qui succède à ce maximum pourrait être imputée à un manque d'activité des ferments.

En 1950, ULRICH avait déjà, avec Mme LAFON, trouvé pour la tomate le maximum d'intensité respiratoire au moment du changement de couleur.

SAULNIER-BLACHE (1963) mesure séparément l'intensité respiratoire de raisins verts et de raisins vérés, et constate une augmentation de l'absorption d'oxygène par la baie avant la véraison et une inhibition brusque après.

D'après nos résultats sur la teneur du raisin en riboflavine et ceux des travaux précédents effectués sur son intensité respiratoire, on peut émettre l'hypothèse que les évolutions de ces éléments sont liées. L'augmentation de la riboflavine que nous constatons dans le grain vert et sa diminution dès l'apparition de la coloration semblent correspondre aux variations de l'intensité respiratoire, ces deux éléments varieraient dans le même sens aux mêmes périodes.

Évidemment, la riboflavine n'est certainement pas le seul facteur influençant

l'intensité respiratoire, mais elle peut apporter sa contribution au sein d'un ensemble de corps qui agissent sur la respiration du fruit.

S'il en était ainsi, la teneur en riboflavine du raisin pourrait avoir une influence sur la date de sa maturité.

CONCLUSION

On peut représenter l'évolution de la riboflavine, considérée comme constituant d'un enzyme respiratoire, dans le raisin au cours de son développement, de la façon schématique et hypothétique suivante : pendant la phase de croissance végétative, c'est-à-dire de multiplication cellulaire, le raisin vert, qui possède une activité physiologique intense, élaborerait des quantités assez importantes de riboflavine qui contribueraient à provoquer l'accélération de la respiration, la quantité de riboflavine élaborée étant supérieure à celle qui disparaît par usure.

Dès la disparition de la chlorophylle et l'apparition de la coloration, dès que les cellules de la baie cessent de se multiplier pour s'accroître en volume, le fruit devient un organe de réserve à vie ralentie, il n'élaborerait plus de riboflavine ou n'en élaborerait que peu, ce qui entraînerait, en partie, un ralentissement de la respiration du fruit.

Reçu pour publication en décembre 1967.

SUMMARY

CHANGES IN THE RIBOFLAVIN CONTENT OF GRAPES DURING DEVELOPMENT

The authors determined the riboflavin content of the whole grape, and of the juice and the solid constituents (pellicle + pulp) separately. The riboflavin content is low in the green fruit, increased up to ripening, then decreased, levelled off, and again decreased after complete maturity. The authors believe that riboflavin is a constituent of a respiratory enzyme and that changes in the respiratory intensity of the fruit during development can be related to changes in its riboflavin content.

RESUMEN

RIVOFLAVINA EN LA UVA DURANTE EL TRANSCURSO DE SU CRECIMIENTO

Los autores determinan el porcentaje de Rivoflavina de la uva entera, y, acto seguido, separadamente del zumo y de los componentes sólidos (película + pulpa).

La cantidad de Rivoflavina que se encuentra presente en la uva es reducida en el fruto verde, aumentando hasta el envero, disminuye después y se estabiliza y desaparece después de la madurez completa.

Los autores consideran la Rivoflavina como un componente enzimático respiratorio y piensan que la misma desempeña un papel en la respiración de la uva, y que su evolución guarda relación con el fenómeno de la intensidad respiratoria del fruto.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CASTOR J. G. B., 1953. The B complex vitamins of Musts and Wines as Microbiol growth factors. *Appl. Microbiol.*, **1**, 97-102.

CONNER R. T., STRAUB G. J., 1941. Combined determination of Riboflavin and Thiamin in Food Products *Industr. engng. Chem.* (Anal. Ed.), **13**, 385-388.

FLAVIER H., 1939. Évolution des vitamines B^1 et B^2 au cours de la maturation du raisin et de la fermentation alcoolique. *Bull. Soc. Biol.*, **130**, 499-500.

GENEVOIS L., 1938. Formation et évolution biologique des acides organiques dans les raisins. *Rev. Vitic.* **88**, 103-110 ; 121-125.

GERBER C., 1897. *Recherches sur la maturation des fruits charnus.* Thèse Sci. nat. Paris.

GOODWIN T. W., 1963. *The biosynthesis of vitamins and related compounds.*, p. 38. Academic Press London and New York.

HALL A. P., BRINNER L., AMERINE M. A., MORGAN A. F., 1956. The B Vitamin content of grapes, musts and wines. *Food Res.*, **21**, 362-371.

HOFFER A., ALCOCK A. W., GEDDES W. F., 1944. Some factors affecting the determination of riboflavin by the fluorometric method. *Cereal Chem.*, **21**, 515 523.

KEVEI E., KISZEL M., SIMEK M., 1955. Polarographie determination of the riboflavin and thiamin contents of foods. *Acta chim. Acad. Sci. hungar.*, **6**, 345-362.

Methods of vitamin assay 1947 et 1966. *Prepared and edited by the Association of vitamin chemists Inc.* Interscience publishers, Ltd London.

MORGAN A. F., NOBLES H. L., WIENS A., MARSH G. L., WINKLER A. J., 1939. The B vitamins of California grape juices and wines. *Food Res.*, **4**, 217-229.

PERLIMAN L., MORGAN A. F., 1945. Stability of B vitamins in grape juices and wines. *Food Res.*, **10**, 334-341.

PEYNAUD E., LAFOURCADE S., 1958. Évolution des vitamines B dans le raisin. *Qual. Plant. materiae veg.* Vol. **3** et **4**, 405-414.

RANDOUIN (Mme Lucie), 1928. Recherches sur la valeur alimentaire des jus de raisins frais et des vins au point de vue de leur teneur en vitamines. *Bull. Soc. sci. Hyg. aliment.*, **16**, 464-486.

SAULNIER-BLACHE P., 1963. Étude du développement du raisin. I. Croissance, accumulation des protéines et respiration pendant le passage de la phase végétative à la maturation. *Ann. Physiol. vég.*, **5**, 217-228.

ULRICH R., LAFON (Mme Jeanine), 1950. L'intensité respiratoire des fruits de tomate à plusieurs stades de leur développement et ses variations sous l'effet des blessures. *C. R. Acad. Sci.*, **230**, 459.

ULRICH R., 1952. *La vie des fruits*, p. 198. Masson et Cie, Éditeurs.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (4), 321-331.

RECHERCHES SUR L'ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN GLUCIDES ET EN ACIDES AMINÉS DANS LA PREMIÈRE PHASE DE LA VINIFICATION EN ROUGE

V. LEPADATU, Ioana TANASE

Station expérimentale viticole Valea Calugareasca, Ploiesti (Roumanie)
Collective de Chimiothérapie de l'Académie roumaine, Bucarest (Roumanie)

SOMMAIRE

Nous avons étudié les constituants qui subissent des transformations importantes au cours de la première étape de la vinification en rouge allant du moût jusqu'à la séparation du vin de la lie au premier soutirage.

INTRODUCTION

Depuis quelque temps on accorde une attention toujours croissante à la connaissance des processus biochimiques qui accompagnent la transformation du moût en vin, surtout dans le but de préciser les possibilités de la conservation de la qualité du vin et de son amélioration. En même temps on cherche à assurer pour une durée aussi longue que possible le maintien de la composition physico-chimique, grâce à différents procédés technologiques (Ribéreau-Gayon, 1961 ; Tercelj, 1965-1966). A cette fin, nombre de recherches tentent d'élucider les causes qui conduisent à l'apparition et à l'évolution des constituants azotés et des glucides, constituants qui participent à l'amélioration de la qualité et sont en bonne partie responsables de son maintien (Bourdet et Hérard, 1958; Weiss et coll., 1959-1960; Lafon-Lafourcade et Peynaud, 1961 ; Flanzy et coll., 1962-1965 ; Koch, 1963 ; Poux et coll., 1964 ; Deibner et Bayonove, 1965 ; Jones et coll., 1965).

Le présent travail a eu pour but de suivre l'évolution des acides aminés en parallèle avec celle des glucides, dans la première étape de la vinification en rouge.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La matière première était constituée de raisins de la variété *Pinot Noir* provenant du vignoble de Valea Calugareasca ; la quantité utilisée a été de 500 kg. Après les opérations préliminaires (foulage, égrappage), le moût ainsi que les parties solides (peaux, pulpes) ont été soumis au processus de fermentation alcoolique sous l'action des levures de la microflore spontanée ; par la suite, on a procédé aux interventions technologiques habituelles à la vinification en rouge. Les raisins ont été cueillis dans une phase avancée de surmaturation, c'est-à-dire 25 jours après la maturité totale, alors qu'une partie des grains présentaient un léger dessèchement et qu'environ 20 p. 100 d'entre eux avaient subi une faible dégradation, due en partie aux moisissures. La température du local de cuvaison était de 16°C ; celle du milieu soumis à la fermentation a varié en fonction de l'allure de la fermentation, jusqu'à un maximum de 27°C (tabl. 2). En outre, on a déterminé l'indice de permanganate, le nombre de levures, la densité d'après les méthodes courantes de laboratoire et la teneur en tanin, selon LÖWENTHAL.

TABLEAU I

Dates des prélèvements des échantillons au cours du processus de vinification en rouge (1)

N° de l'échantillon	Date	Phases du processus technologique
1	29 septembre	Préfermentation.
2	30 septembre	Préfermentation.
3	1er octobre	Préfermentation.
4	2 octobre	Préfermentation et début de la fermentation tumultueuse.
5	4 octobre	Fermentation tumultueuse, séparation du moût semifermenté des parties solides.
6	8 octobre	Fin de la fermentation lente, entonnage.
7	13 octobre	Autolyse des levures, maintien du vin sur la lie.
8	18 octobre	Autolyse des levures, maintien du vin sur la lie.
9	29 octobre	Séparation du vin et de la lie.

(1) La stabilisation des échantillons après le prélèvement a été effectuée avec du benzoate de sodium.

La détermination des glucides et des acides aminés libres et combinés a été effectuée aux moments principaux des étapes du processus technologique, du moût au vin jeune (tabl. 1). L'activité biologique a été arrêtée avec du benzoate de sodium à 1 g par litre, après le prélèvement des échantillons. Pour la détermination des glucides et des acides aminés (libres et combinés) on a utilisé la chromatographie sur papier, selon la méthode décrite dans des travaux antérieurs (TANASE, 1967 (13)).

Le matériel destiné à la détermination des glucides a été préalablement centrifugé. Les constituants séparés sur le chromatogramme ont été révélés avec la solution aniline-acide orthophosphorique-diphénylanine (solution 4 p. 100 d'aniline et de diphénylamine préparée à la proportion de 5 : 1 dans de l'acide orthophosphorique) ; le dosage a été effectué selon LEDERER (1960 (9)), HAIS et MACEK, (1960 (6)).

La séparation des acides aminés libres a été effectuée à partir du matériel déprotéinisé, à chaud, avec de l'alcool à 96°, pendant 10 minutes au bain-marie. Le liquide clair obtenu après la centrifugation a été évaporé jusqu'à siccité et ensuite repris dans une solution ammoniacale 0,5 N, en vue de la filtration. Le filtrat a été appliqué, en quantité déterminée sur du papier Whatman n° 1 (13). La séparation des acides aminés des structures protéiques et peptidiques a été effectuée en soumettant le matériel (moût et vin) à l'hydrolyse en présence d'HCl 5 N pendant 4 heures à 90°C. L'hydrolysat, ramené au volume de 10 ml, a été filtré afin d'éliminer les substances humiques ; par la suite, il a été soumis aux mêmes opérations que celles utilisées dans le cas des acides aminés libres. L'application sur papier a été pratiquée à des concentrations au-dessous de la limite de sensibilité des acides libres, afin d'exclure toute possibilité d'interférence avec ces derniers. L'évaluation quantitative des acides aminés a été faite après la formation du complexe alanine-ninhydrine-chlorure de cadmium décrite par BAROLLIER et modifiée par nous (TANASE, 1967). La couleur rouge formée a été extraite au méthanol pendant 24 heures à la température du laboratoire et ensuite mesurée à 530 mμ au spectrophotomètre.

RÉSULTATS OBTENUS

Par suite d'une durée prolongée de l'état de préfermentation, pour les raisons précisées au chapitre « Matériel et Méthodes », le déclenchement de la fermentation tumultueuse s'est produit sous l'action d'un nombre considérable de levures (150 millions/ml), ce qui a eu pour conséquence une hausse de la température du milieu qui a rapidement atteint 27°C, ainsi que d'abréger la durée de la cuvaison du mélange liquide corps solides (tabl. 2).

Le contenu du moût en substances tannoïdes et en polyphénols a augmenté, durant cet intervalle, d'environ quatre fois. Au moment de la séparation du moût semi-fermenté, ces valeurs ont dépassé de presque sept fois les valeurs initiales. Dans les phases suivantes l'indice de permanganate diminue généralement, à cause des phénomènes d'insolubilisation et de dépôt des substances tannoïdes et colorantes rouges (tabl. 2), phénomènes qui continuent lentement aussi durant l'évolution du vin. Les hausses légères enregistrées par l'indice de permanganate peuvent être mises en partie sur le compte des processus d'autolyse des levures, dont le contenu passe dans la masse du vin.

En considérant l'évolution des glucides par phases technologiques, on constate que durant la préfermentation les levures consomment pour leur multiplication des quantités réduites de sucres (10,4). La concentration initialement élevée en sucres constitue un élément inhibiteur pour les levures de la microflore spontanée. Dans la phase de fermentation tumultueuse, les levures métabolisent d'abord le glucose et ensuite le fructose. Finalement, le rapport glucose-fructose du vin demeure inférieur à l'unité. Un fait se distingue nettement vers la fin de la fermentation : après la séparation du moût semi-fermenté et jusqu'à la dernière observation, on constate la hausse du contenu en saccharose. Cette augmentation peut trouver une explication dans l'action des systèmes enzymatiques qui agissent sur les polysaccharides ou les glucosides se trouvant dans les parties solides des grains. Le contenu en saccharose est double par rapport à la quantité initiale, mais ne dépasse toutefois pas 0,5 g/litre (Fig 1).

En ce qui concerne la teneur du moût en acides aminés libres et combinés, il faut mentionner que dans l'intervalle qui marque les phases de préfermentation (échan-

TABLEAU 2

Évolution des principaux facteurs et constituants au cours du processus technologique de vinification en rouge

Facteurs et Composants	Préfermentation 3 1/2 jours			Fermentation tumultueuse 2 1/2 jours		Fermentation lente 4 jours		Autolyse 21 jours	
	29-9	30-9	1-10	2-10	4-10	8-10	13-10	18-10	29-10
					Séparation du moût et du marc	Entonnage			Séparation du vin et de la lie
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Température du milieu	17	17	18,5	20	27	20	18	13	12
Nombre de cellules (millions/ml)	—	1,3	3,8	80	150	101	30,6	16,2	1,2
Indice de permanganate	3,8	8,5	12,6	15,2	25	21,8	20,6	20,7	21,4
Densité	1 105	1 104	1 103	1 070	1 010	—	—	—	—
Saccharose en g/l	0,2	0,2	0,3	0,2	0,35	0,4	0,4	0,5	0,5
Glucose en g/l	—	—	—	—	5,0	1,0	0,5	0,6	0,5
Fructose en g/l	—	—	—	—	8,0	2,0	1,2	1,1	1,3
Arabinose en g/l	0,5	0,6	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1
Total sucres en g/l	240,7	234,8	228,6	216,5	13,55	3,6	2,2	2,4	2,4
Total acides aminés libres en mg/l	243	306	280	333	374,5	312,6	344,5	382,7	443,7
Total acides aminés combinés (mg/l)	690	729	753	821	402	354	398	387	429

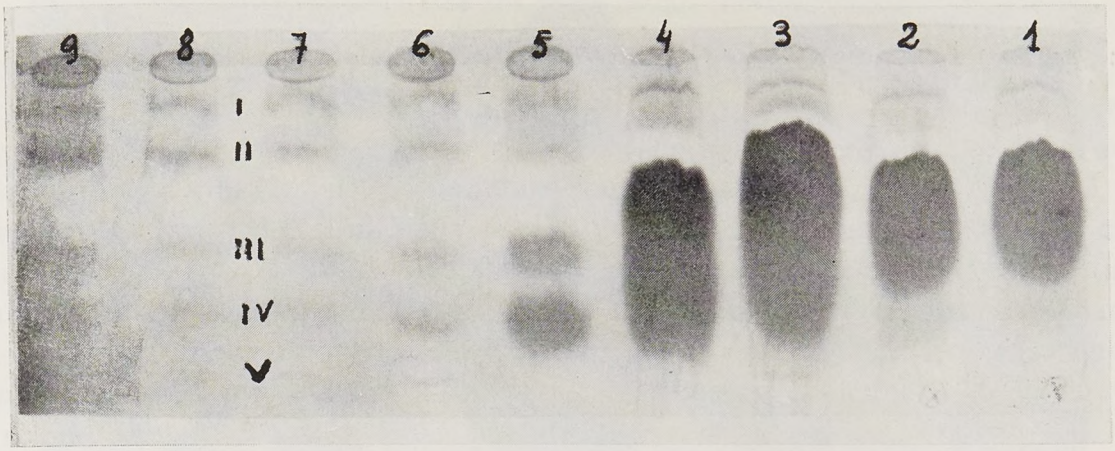


FIG. 1. — *Chromatogramme des glucides libres*

I = ?
II = saccharose
III = glucose
IV = fructose
V = arabinose
x = les deux premiers échantillons ont été chromatographiés après une dilution à 1/2

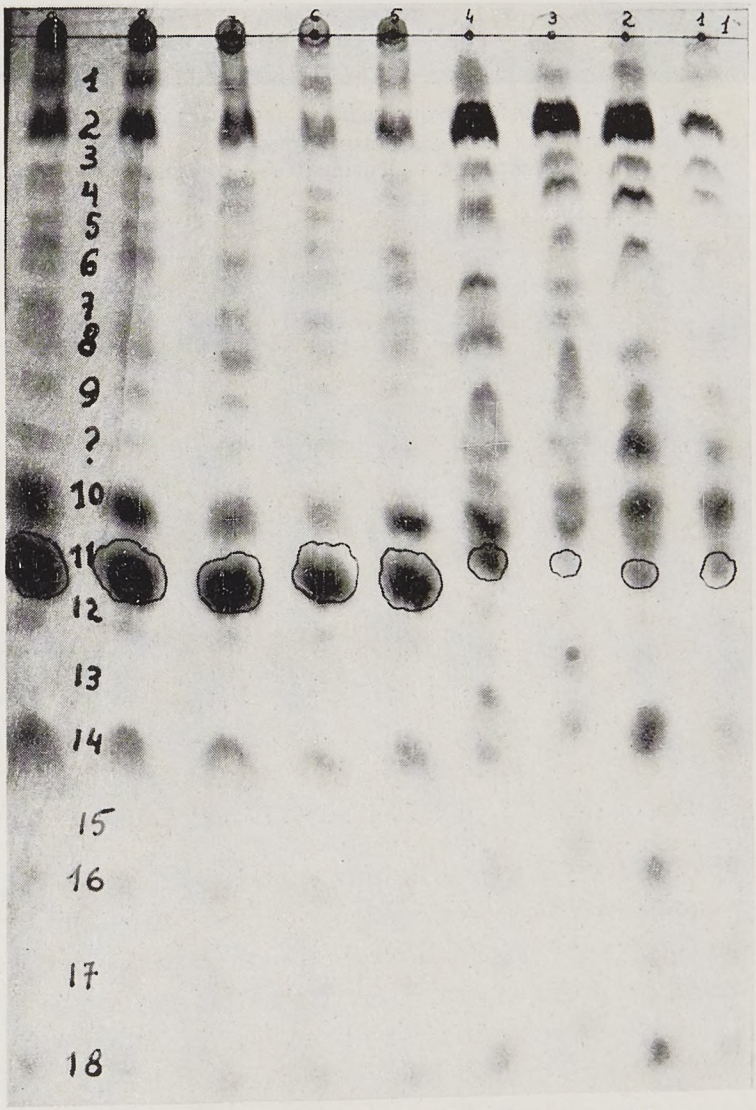


FIG. 2. — *Chromatogramme des acides aminés libres*

Ordre des acides aminés : 1. — cystéine ; 2. — lysine ; 3. — histidine ; 4. — arginine ; 5. — glutamine ; 6. — asparagine ; 7. — sérine ; 8. — glycocolle ; 9. — thréonine ; 10. — alanine ; 11. — proline ; 12. — tyrosine ; 13. — acide α-aminobutyrique ; 14. — acide γ-aminobutyrique ; 15. — méthionine ; 16. — valine ; 17. — phénylalanine ; 18. — leucine.

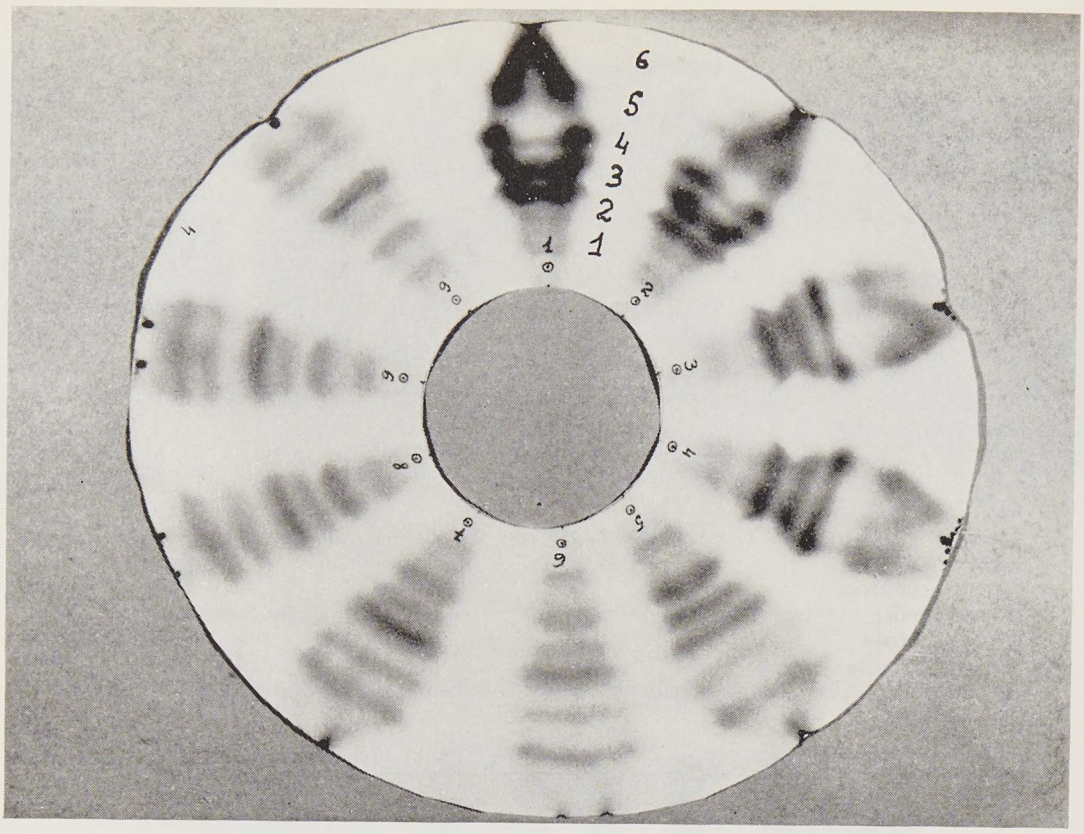


FIG. 3. — *Chromatogramme radiaire des acides aminés liés*
Ordre des acides aminés : 1. — acide aspartique ; 2-3. — acide glutamique 4-α alanine ; 5. — leucine ; 6. — cystine.

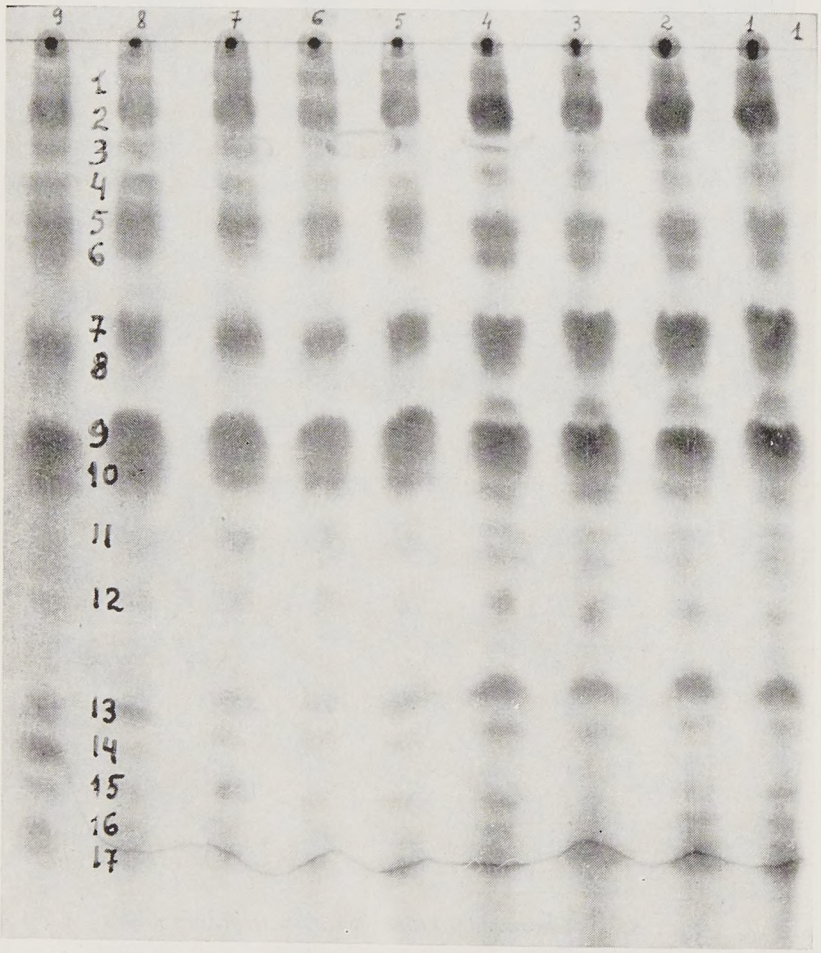


FIG. 4. — *Chromatogramme descendant des acides aminés liés*
Ordre des acides aminés : 1. — cystéine ; 2. — lysine ; 3. — histidine ; 4. — arginine ; 5. — sérine ; 6. — glycocolle ; 7. — acide glutamique ; 8. — thréonine ; 9. — alanine ; 10. — proline ; 11. — tyrosine ; 12. — acide γ-aminobutyrique ; 13. — acide α-aminobutyrique ; 14. — valine ; 15. — phénylalinine ; 16. — isoleucine ; 17. — leucine.

tillons 1-4) on enregistre des valeurs augmentées vers la fin de cette étape (4, 10, 11) (fig. 2-4, tabl. 2-4). Parmi les acides aminés libres on trouve en plus grandes quantités la lysine et la proline et parmi ceux qui sont combinés, l'acide glutamique, l'acide aspartique, l'alanine, la lysine, la proline, l'arginine et l'acide amino-butyrique. Ces données confirment les résultats obtenus jusqu'à présent par la plupart des chercheurs (6, 8, 14, 15). Cette légère augmentation du contenu en acides aminés dans la phase de préfermentation est probablement en relation avec leur libération des parties solides (8), comme conséquence du processus de macération, dont le déclenchement débute en même temps que la multiplication des levures et la hausse de la température du milieu (tabl. 2).

TABLEAU 3

Composition en acides aminés combinés en mg/l

Acides aminés combinés	N° de l'échantillon conformément au tableau 1								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Cystéine	3	7	2	5	3	2	9	8	6
2. Alanine	44	36	40	48	20	16	17	23	24
3. Glycocolle	7	8	9	8	3	5	2	3	4
4. Arginine	52	56	50	67	25	24	20	26	22
5. Tyrosine	38	31	36	34	20	22	28	19	21
6. Valine	16	24	27	25	14	9	16	18	17
7. Phénylalanine	13	16	14	10	5	4	6	3	4
8. Leucine	29	33	26	31	22	19	18	19	20
9. Acide glutamique	180	177	188	190	131	109	127	113	128
10. Acide aspartique	48	41	43	40	25	21	27	28	32
11. Lysine	42	76	80	84	21	28	24	20	31
12. Cystine	18	19	16	24	—	—	—	—	—
13. Proline	60	54	62	70	44	51	42	40	39
14. Sérine	21	28	24	26	9	8	11	13	14
15. Thréonine	15	17	16	18	14	7	6	5	9
16. Tryptophane	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17. Histidine	17	22	18	19	16	5	7	8	10
18. Isoleucine	11	12	15	16	6	4	7	5	7
19. Méthionine	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces
20. Acide α-aminobutyrique	50	44	62	79	24	20	31	41	40
21. Acide γ-aminobutyrique	26	28	25	27	—	—	—	—	—
Total	690	729	753	821	402	354	398	387	429

Dans la phase des fermentations tumultueuses le contenu en acides aminés est au minimum et se maintient comme tel jusqu'à sa fin ; il augmentera dans les phases qui suivent et jusqu'à la séparation du vin de la lie (11, 10, 15). Parmi les acides aminés qui enregistrent des hausses quantitatives, après la fin de la phase de fermentation tumultueuse, s'inscrivent en premire lieu, la cystine, l'alanine, la valine, l'acide glutamique, l'acide aspartique, la sérine, l'histidine, l'acide α-amino-butyrique et, tout spécialement pour les acides aminés libres la proline, cas rarement indiqué dans la littérature œnologique. Les 12 autres acides aminés demeurent à un niveau pratiquement égal au niveau minimum pour l'intervalle étudié.

Cette évolution est le résultat de l'action des levures, qui, en les utilisant comme

substrat nutritif dans leur métabolisme, les cèdent en grande partie au milieu vin, d'une part par exsorption, d'autre part à mesure qu'elles meurent et s'autolysent (2, 4, 8, 15). On constate une différence marquée en ce qui concerne l'acide glutamique des structures peptidiques et protéiques, par rapport à la proline (fig. 2-4, tabl. 3-4). Ainsi, dans la phase de préfermentation, l'acide glutamique libre se trouve en quantités réduites et approximativement égales à celles de la proline ; dans les phases ultérieures, la proline augmente de manière marquée — ainsi que nous l'avons dit plus haut — tandis que l'acide glutamique continue à présenter des valeurs diminuées. A mentionner que l'acide glutamique combiné offre des valeurs sensiblement plus élevées, en comparaison avec la proline combinée.

TABLEAU 4

Composition en acides aminés libres en mg/l

Acides aminés libres	N° de l'échantillon conformément au tableau 1								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Cystéine	2	4	3	5	1,4	1,3	2,0	1,7	2,2
2. Alanine	23	21	26	28	19	24	20	25	20
3. Glycocolle	4	5	7	6	3	3,3	4,4	2,8	1,9
4. Arginine	16	14	13	18	8	6	7	5	7
5. Tyrosine	9	7	8	1	5	4	4	3,7	4,7
6. Valine	5	1	10	14	9	8	9	7	7,8
7. Phénylalanine	7	9	7	11	5	4	6,6	5,7	6
8. Leucine	14	19	13	20	10	7	8	9	10
9. Acide glutamique	19	26	17	31	11	9	13	12	8
10. Acide aspartique	7	5	9	8	6	3	4	5	6,4
11. Lysine	16	60	48	54	10	7	a4	11	15
12. Cystine	4	6	8	5	—	—	—	—	—
13. Proline	41	52	33	50	250	190	240	260	300
14. Sérine	11	9	14	10	4	5	6	4	3,8
15. Thréonine	10	8	12	11	5	3	4	5	6
16. Tryptophane	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17. Histidine	7	6	9	8	2,1	2	3,5	4	4,6
18. Isoleucine	8	10	11	7	3	5	4	6	3,3
19. Méthionine	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces	traces
20. Acide α-aminobutyrique	24	26	18	19	20	21	20	23	24
21. Acide γ-aminobutyrique	6	8	15	16	3	4	5	2,8	3
Total	243	306	280	333	374,5	312,6	344,5	382,7	443,7

Si le contenu élevé en proline libre peut trouver une explication, d'une part, dans l'autolyse des levures, dont la structure renferme des protéines contenant la proline en quantités plus marquées, et, d'autre part, dans l'action de scission des peptides existant dans la masse de liquide moût-vin, on ne peut expliquer la présence de l'acide glutamique combiné en quantités élevées, que par l'existence de protéines dans la masse solide, protéines dont la structure comprend cet acide comme élément prépondérant.

Le maintien à des valeurs relativement constantes de l'alanine et de l'acide aminobutyrique libres au moment où le reste des acides aminés enregistre des baisses (phase de fermentation tumultueuse), indique le fait qu'à l'intérieur de la masse liquide la

fraction d'acides aminés active au point de vue fermentaire est constituée par les acides aminés libres à l'exception des deux premiers, mais non pas par ceux liés des structures protéiques et peptidiques.

CONCLUSIONS

1° La méthode chromatographique de partage sur papier appliquée aux glucides offre la possibilité de séparer à partir du moût et du vin, cinq constituants glucidiques. Cette méthode permet également de déceler l'addition frauduleuse des glucides, ainsi que de préciser le seuil minimal de saccharose qui entre dans la composition normale du vin.

2° Par l'application de la méthode chromatographique de partage sur papier, on a la possibilité de séparer 21 acides aminés libres et combinés.

3° Dans la phase de préfermentation, la dégradation des glucides par les levures se fait à un taux réduit, ces dernières utilisant de préférence l'azote assimilable, représenté dans nos recherches par les acides aminés libres.

4° La hausse du taux d'acides aminés libres et combinés dans la phase de préfermentation est le résultat de l'activité des levures qui ramollissent les parties solides soumises à la fermentation pendant la formation du moût et rendent possible la libération des composants azotés. L'évolution du contenu en acides aminés et celle des substances polyphénoliques marquent dans la phase de préfermentation une corrélation positive, corrélation qui interférera pendant la période de fermentation tumultueuse.

5° La diminution de la teneur en composés azotés dans l'intervalle qui marque les phases de fermentation tumultueuse et lente est le résultat de la fermentation des glucides et de la formation de l'alcool, phénomènes qui gênent par la suite l'activité des levures, en les obligeant à la consommation des acides aminés, qui constituent l'unique source d'alimentation dont elles disposent encore.

7° Pendant l'intervalle de la fermentation alcoolique du moût avec le marc, s'établit un équilibre dynamique entre les constituants glucidiques (glucose, fructose) et les acides aminés, les deux séries de constituants s'avérant actifs au point de vue fermentaire.

8° L'augmentation du taux de proline après la fermentation semble être un cas particulier rarement rencontré dans la littérature œnologique.

Reçu pour publication en novembre 1967.

SUMMARY

CHANGES IN THE CARBOHYDRATE AND AMINO ACID CONTENTS DURING THE PRIMARY STAGE OF MAKING RED WINE

During the first stage in making red wine, from the must up to the separation of the wine from its lees at the first bottling, determinations were carried out of the constituents which undergo most significant transformations, namely carbohydrate, free and combined amino acids, tannin, colouring substances, permanganate index, and number of yeast cells. The first material was made up of 500 kg of *Pinot Noir* grapes.

Vinification was carried out by the classical method used for the preparation of red wines. The carbohydrate and amino acids were determined by paper chromatography.

During the pre-fermentation phase the degradation of the carbohydrate by the yeast is reduced. After the transformation into alcohol of the principal carbohydrate (glucose and fructose) these remained in reduced quantities and were found in a ratio of less than 1. The sucrose content at the end of fermentation was doubled in relation to the quantity in the must.

The amino acids behaved differently in all the stages studied, their content increasing slightly in the course of the pre-fermentation phase, then decreasing considerably during tumultuous fermentation, and increasing again in the autolysis phase. This development is the result of the action of the yeasts which, by using the acids as nutritive substrates for their metabolism, give up again them, partly by synthesis and partly as a result of autolysis.

RESUMEN

INVESTIGACIONES ACERCA DE LA EVOLUCIÓN DEL PORCENTAJE DE GLÚCIDOS Y DE ÁCIDOS AMINADOS EN LA ETAPA PRIMARIA DE LA VINIFICACIÓN EN TINTO

Durante el transcurso de la primera etapa de la vinificación en tinto, que va desde el mosto a la separación del vino de sus heces en el primer trasiego, se han efectuado determinaciones de los componentes que sufren las transformaciones más importantes, a saber : glúcidos, ácidos aminados libres y combinados, tanino, substancias colorantes, índice de permanganato y número de células de levaduras. La materia prima ha estado constituida, en el caso presente, por uvas de la variedad *Pinot Noir*, en cantidad de 500 kg.

La vinificación ha sido llevada a cabo según el método clásico utilizado para la preparación de los vinos tintos. Los glúcidos y los ácidos aminados han sido determinados por el método cromatográfico sobre papel.

Las investigaciones efectuadas han servido para demostrar que, en la etapa de prefermentación, la degradación de los glúcidos por las levaduras es reducida. Después de la transformación en alcohol de los principales glúcidos glucosa y fructosa estos permanecen en cantidates reducidas y se encuentran en una relación inferior a 1. El contenido en sacarosa al final de la fermentación ha quedado duplicado en relación con la cantidad registrada en el mosto.

Los ácidos aminados han manifestado — durante toda la etapa estudiada — un comportamiento diferente. Su contenido aumenta ligeramente durante el transcurso de la etapa de prefermentación y, acto seguido, va descendiendo de manera señalada durante la fermentación agitada y aumenta de nuevo durante la etapa de autólisis. Esta evolución constituye el resultado de la acción de las levaduras que, al utilizarlas como substratos nutritivos para su metabolismo, vuelven a cederlas, en parte, después de síntesis y, en parte también, como consecuencia del proceso de autólisis.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BAROLLIER J., 1955 Ein ninhydrinreagenz für quantitative aminosaürebestimungen auf Papierchromatogrammen. *Naturwissenschaften*, **42**, 416.

BOURDET A., HÉRARD J., 1958. Influence de l'autolyse des levures sur la composition phosphatée et azotée des vins. *Ann. Technol. agric.*, **7**, 177.

DEIBNER L., BAYONOVE C., 1965. Dosage gazovolumétrique des hexosamines libres et des aminoacides libres dans les jus et les vins après leur séparation au moyen des échangeurs d'ions. *Chim. anal.*, 512.

FLANZY C., POUX Ch., FLANZY M., 1964. Les levures alcooliques dans les vins. Protéolyse et Proteogenèse. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 283.

FLANZY C., POUX Ch., 1965. Note sur la teneur en acides aminés du moût de raisin et du vin en fonction des conditions de l'année. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 48.

HAIS J. M., MACEK E., 1960. *Cromatografia pe hirtie, Bucaresti.* Ed. Tehnica.

KOCH J., 1963. Protéines des vins blancs, traitements des précipitations protéiques par chauffage et à l'aide de la bentonite. *Ann. Technol. agric.*, **12**, (hors-série nº 1), 297-313. (Symposium intern. d'œnologie, Bordeaux, 10-15 juin 1963).

LAFON-LAFOURCADE P., PEYNAUD E., 1961. Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. *Ann. Technol. agric.*, **143**.

LEDERER E., 1960. *Chromatographie en chimie organique et biologique*, vol. II, éd. Masson.

POUX Ch. FLANZY C., FLANZY M., 1964. Les levures alcooliques dans les vins. Protéolyse et Protéogenèse. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 283.

RIBÉREAU-GAYON J., RIBÉREAU-GAYON P., *Traité d'Œnologie*, 1960 I et 1961 II, Paris, 352.

JONES M., POWER D. M., PIERCE J.-S., 1965. The adsorption of α aminoacides by culture yeasts. *Europ. Brew. Conv., Rep. Barley Comm.*, p. 182.

TANASE I., 1967. *Tehnica cromatografica*. Ed. Tehnica, Bucaresti.

TERCELJ D., 1965. Étude des composés azotés du vin. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 4, 307.

TERCELJ D., 1966. La diminution des composés azotés dans le vin par différents collages. *Ann. Technol. agric.* , **15**, 1, 73.

WEISS H., ROUSSETT A., BONNET R., 1959. L'évolution de différentes formes d'azote au cours de la fermentation des moûts de raisin provenant de cépages d'Alsace. *C. R. Acad. Sci.*, **249**, 1796.

WEISS H., ROUSSET A., MAILLARD M. T., BONNET R., 1960. L'évolution qualitative et semiquantitative des aminoacides au cours de la fermentation de moûts de raisin provenant des cépages d'Alsace. *C. R. Acad. Sci.*, **259**, 1322.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (4), 333-347.

TECHNIQUES DE VINIFICATION EN ROUGE ET POTENTIEL OXYDORÉDUCTEUR[1]

J. MOURGUES, P. BÉNARD, C. FLANZY, C. JOURET

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est, 84 - Montfavet
Station d'Agronomie et d'Œnologie, 67, boulevard Deltour, 31 - Toulouse
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

La mise au point et l'utilisation de nouvelles techniques de vinification, l'évolution des vins correspondants, appellent des comparaisons mesurables entre les différentes techniques.

Le potentiel d'oxydoréduction est une de ces données de comparaison.

Des mesures ont donc été effectuées durant la fermentation, les soutirages et la conservation en récipients divers sur des vins rouges élaborés dans les conditions de la pratique selon plusieurs techniques.

INTRODUCTION

Les travaux concernant l'évolution du potentiel oxydoréducteur au cours de l'élaboration et de la conservation des vins ont été analysés par DEIBNER (1957, *a*, *b*, *c*) dans une série de mises au point.

Depuis, FERENCZI (1961-1962) sur des vins blancs de Tokay, a précisé que si le sulfitage du moût influe sur le déclenchement de la fermentation alcoolique, il ne modifie pas de façon notable l'évolution du potentiel d'oxydoréduction pendant la fermentation. Cet auteur a montré également que la fermentation malolactique détermine un abaissement de potentiel.

Récemment CHAUVET et *al.* (1966) ont étudié l'évolution du potentiel oxydoréducteur au cours de l'élaboration des vins rouges par vinification traditionnelle beaujolaise et vinification par macération carbonique.

[1] Ce travail entre dans le cadre des recherches sur la méthode de vinification par macération carbonique. Les comptes rendus de deux études précédentes ont été publiés dans les *Annales de Technologie agricole*, 1967, **16**, 109-116, 117-123.

TABLEAU I

Données relatives aux différents essais de vinification

	Poids des raisins (kg)	Durée de cuvaison (j)	Température moût (°C)	Densité du moût au cours du cuvage	Vin de goutte (hl)	Vin de presse (hl)	Poids du marc (kg)	Poids des rafles
Essais 1964								
Macération carbonique :								
1er essai	7 152	10	21 à 26,5	1 090 à 1 000	39,7	20,0	780	
2e essai	8 062	9	21,5 à 27,0	1 085 à 999	43,0	21,6	900	
Raisins foulés :								
1er essai	7 211	5	21 à 32,6	1 080 à 1 004	50,5	9,5	700	
2e essai	7 956	4	21,5 à 35,5	1 085 à 1 010	56,0	11,5	860	
Raisins éraflés :								
1er essai	7 197	6	22,2 à 32,6	1 082 à 1 004	49,0	10,2	580	95,8
2e essai	8 043	5	20,5 à 35,6	1 090 à 1 006	57,5	10,1	740	118,9
Essais 1965								
Macération carbonique	7 498	11	20,2 à 27,0	1 110 à 995	52	11,5	831	
Raisins foulés	7 507	6	21 à 32,2	1 089 à 999,5	48	17	680	

Ces auteurs n'ont pas trouvé de différence au point de vue de l'évolution du potentiel redox au cours de ces modes de cuvaison qui se déroulent en l'absence d'oxygène.

Nos recherches concernent l'évolution du potentiel de vins rouges de qualité supérieure (*Corbières*) en fonction :

a) du type de vinification :
— en vendange foulée avec ou sans égrappage,
— par macération carbonique ;

b) du mode de soutirage :
— avec aération dans des cuves méchées ou non,
— sous gaz carbonique ;

c) de la nature des récipients de conservation (cuve, fût, bouteille).

MÉTHODE EXPÉRIMENTALE ET TECHNIQUES UTILISÉES

1. *Élaboration et conservation des vins*

En 1964 les essais comparatifs de vinification en rouge effectués à la cave du Domaine expérimental de Pech-Rouge complètent ceux effectués en 1961 (BÉNARD, JOURET, 1962) et en 1962 ((BÉNARD, JOURET, 1963). Ils comprennent trois techniques d'élaboration de vins rouges menées en parallèle :

raisins entiers foulés,
raisins éraflés,
raisins entiers non foulés (macération carbonique).

En 1965 la vinification par macération carbonique et la vinification de raisins entiers foulés sont seulement étudiées comparativement.

L'encépagement est composé de *Carignan noir* pour le premier essai de 1964, d'un mélange de 66 p. 100 de *Carignan noir*, de 8 p. 100 de *Carignan blanc*, de 22 p. 100 de *Clairette* et de 4 p. 100 de *Terret* pour le second essai de la même année. En 1965 il comprend 76 p. 100 de *Carignan noir* 12 p. 100 de *Grenache blanc* et *gris* et 12 p. 100 de *Carignan*.

La technique d'homogénéisation, le matériel utilisé sont décrits dans des publications précédentes (BÉNARD, JOURET, 1962, 1963). Nous rappelons cependant que les cuves de raisins entiers foulés et de raisins éraflés reçoivent 5 g de SO_2 pour 130 kg de vendange, tandis que la cuve de macération carbonique n'en reçoit pas.

Le tableau 1 indique les caractéristiques des diverses vinifications ; les vins issus de ces essais sont ensuite soutirés dans des récipients différents (tabl. 2). Les fûts et les bouteilles sont logés dans la cave souterraine (température de 15°C ± 1°C et humidité importante).

Pour un soutirage avec aération ménagée, le vin est canalisé à partir du robinet situé à la partie inférieure de la cuve jusqu'au milieu du cuvon en bois de 200 litres qui sert de relais, alors qu'il tombe directement du robinet pour un soutirage avec aération. Le vin est ensuite repris et refoulé sous la voûte de la cuve correspondante.

2. *Déterminations analytiques*

Au cours de travaux antérieurs (DEIBNER-MOURGUES, 1966 *a*), nous avons montré que pour toute étude concernant l'évolution du potentiel oxydoréducteur en fonction du temps, il était déconseillé de laisser les électrodes de platine à demeure dans les vins ou les moûts en fermentation à cause d'une polarisation particulière des électrodes.

Nous avons donc opéré par prélèvements dans des bouteilles de 375 ml désaérées par du gaz carbonique en prenant toutes les précautions nécessaires et en particulier en prélevant toujours à la même hauteur dans les récipients. En effet, le potentiel oxydoréducteur n'est pas identique dans la masse du moût en fermentation ou du vin (MOURGUES-DEIBNER, 1967).

Pendant l'élaboration des vins les échantillons ont été prélevés par le robinet situé à la partie inférieure des cuves.

Pendant la conservation des vins, les prélèvements ont été effectués :

— par immersion de la bouteille jusqu'au milieu des cuves en ciment avec une tige-support munie d'un dispositif permettant d'enlever le bouchon lorsque la bouteille est à la hauteur désirée;

— par siphonnage avec un tube de verre et un tuyau flexible dans le cas des cuves métalliques et des fûts car les ouvertures ne permettent pas l'introduction du support à bouteilles.

Les échantillons recueillis sont analysés au laboratoire dans les deux heures suivant le prélèvement.

TABLEAU 2

Données relatives aux soutirages

Nature des essais	Dates des soutirages	Condition de soutirage	Destination
Essais 1964	14 au 16-10-1964	Abri de l'air, séparation des grosses lies	Cuves de 110 hl méchées à 3 g de soufre par hl (mélange des vins correspondants de 2 séries d'essai)
	20-1-1965	Avec aération	Cuves de 110 hl méchées à 3 g de soufre par hl
	14-6-1965	Avec aération ménagée	Cuves de 80 hl Fûts 600 et 120 l Bouteilles 75 cl
Essais 1965	11 au 13-10-1965	Abri de l'air, séparation des grosses lies	Cuves métalliques de 26 hl (Brauthite) remplies de gaz carbonique
	9-11-1965	Avec aération	Cuves métalliques de 26 hl

Le potentiel oxydoréducteur est mesuré à l'aide d'un potentiomètre à pile « Photovolt » (modèle 125) à + 20°C selon la technique DEIBNER (1966) modifiée DEIBNER-MOURGUES (1966 *b*).

Les teneurs en oxygène libre dissous sont déterminées selon la technique de VETCKER et FILINE-KOLDAKOV (1958) à l'aide d'un polarographe MECI LX 1) muni d'une cellule à enceinte thermorégulée, montée en série avec l'enceinte de la cellule de mesure du potentiel oxydoréducteur.

L'anhydride sulfureux total est déterminé selon la méthode DEIBNER-BÉNARD (1955).

L'indice de permanganate est effectué selon la méthode de RIBÉREAU-GAYON et MAURIE (1942).

Une commission de dégustation comprenant des producteurs et des techniciens a suivi l'évolution des caractères organoleptiques dans ces vins à différents stades de leur conservation.

RÉSULTATS

L'évolution du potentiel oxydoréducteur, de la densité et de la température des moûts en fermentation (essais 1965) est indiquée dans la figure 1.

Les figures 2, 3 et 4 montrent respectivement l'évolution du potentiel redox :

— des vins des essais 1964 conservés en cuves en ciments (110 et 80 hl),

— des mêmes vins en fûts (600 et 120 l),

— des vins des essais 1965 conservés en cuves métalliques (26 hl).

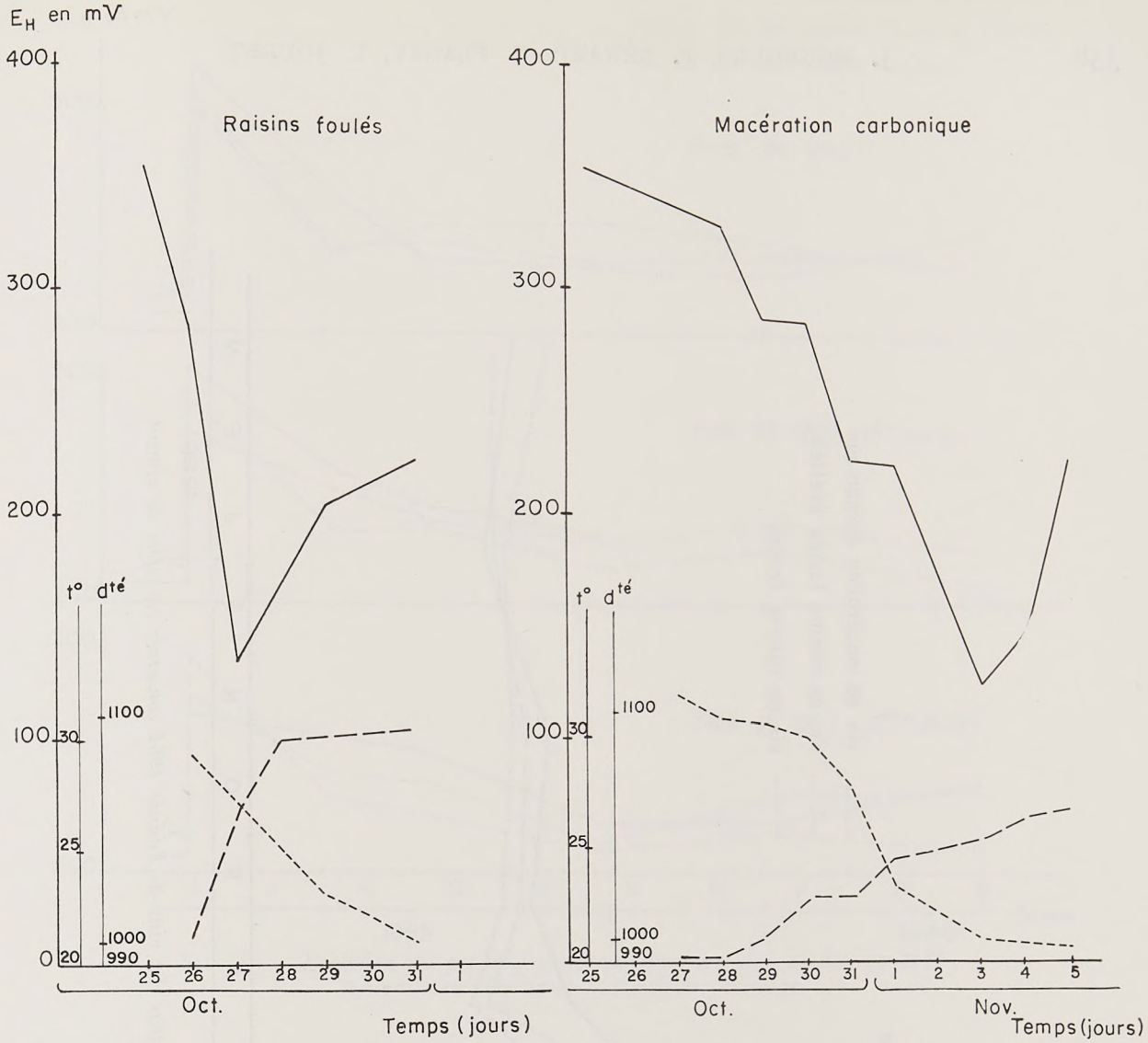


FIG. 1. — *Évolution du potentiel oxydoréducteur, de la densité et de la température des moûts en fermentation*

——— E
- - - - - - t^t
- - - - - - - - $d^{té}$

TABLEAU 3

Valeurs du potentiel oxydoréducteur des vins de goutte et de presse des différents essais de vinification en relation avec la teneur en substances tannoïdes exprimée en indice de permanganate

Vins	pH	Indice de permanganate (méq/l)	E_H en mV à 20°C	
			à l'abri de l'air	après aération pendant 15 mn dans la cellule de mesure
Macération carbonique				
Vins de goutte ...	3,70	43,5	174	355
Vins de presse....	3,72	37,5	203	375
Raisins foulés				
Vins de goutte ...	3,50	38,5	270	365
Vins de presse....	3,78	53,0	205	336

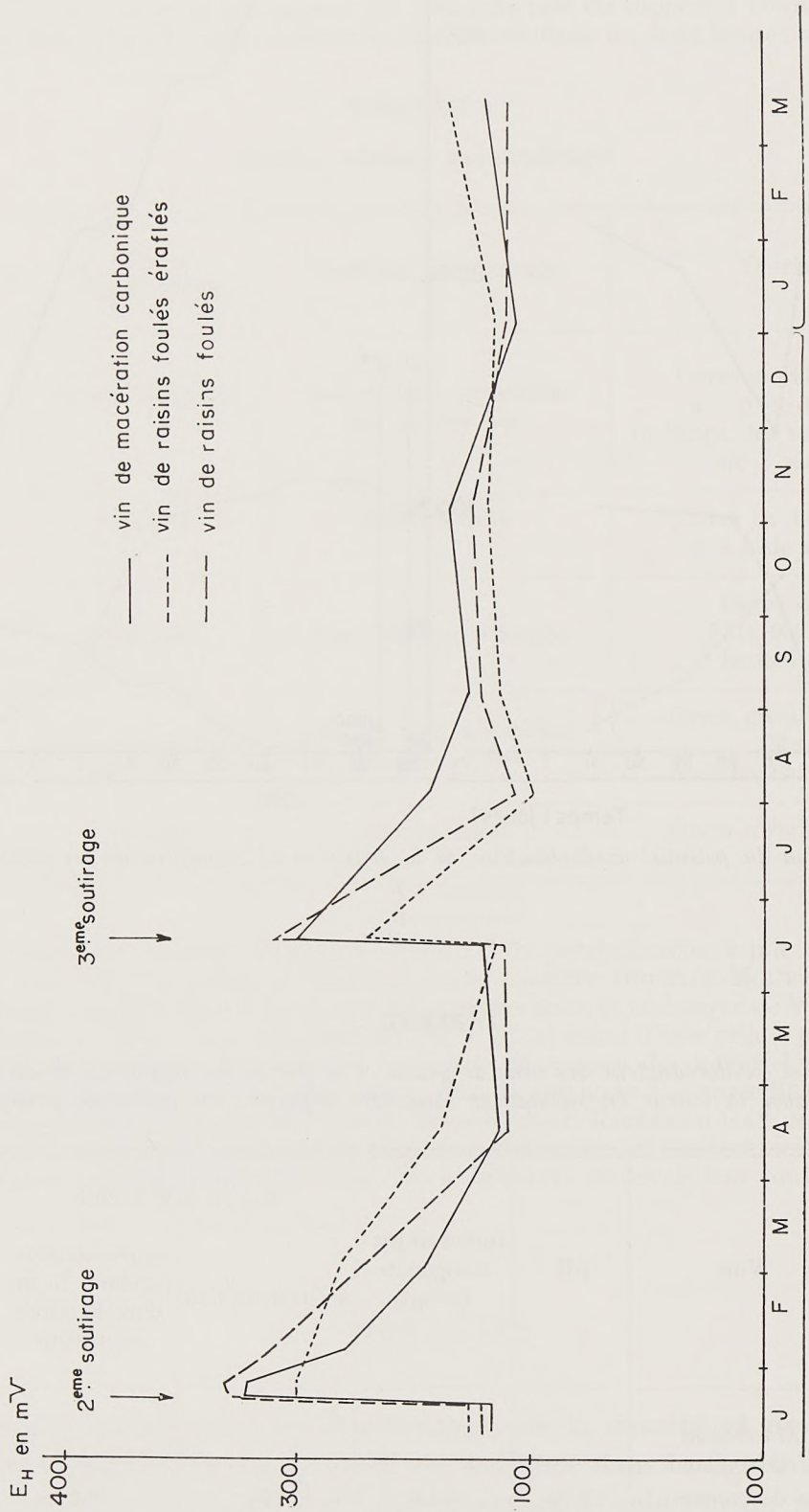


FIG. 2. — *Évolution du potentiel oxydoréducteur des vins de l'année 1964 conservés en cuves de ciment*

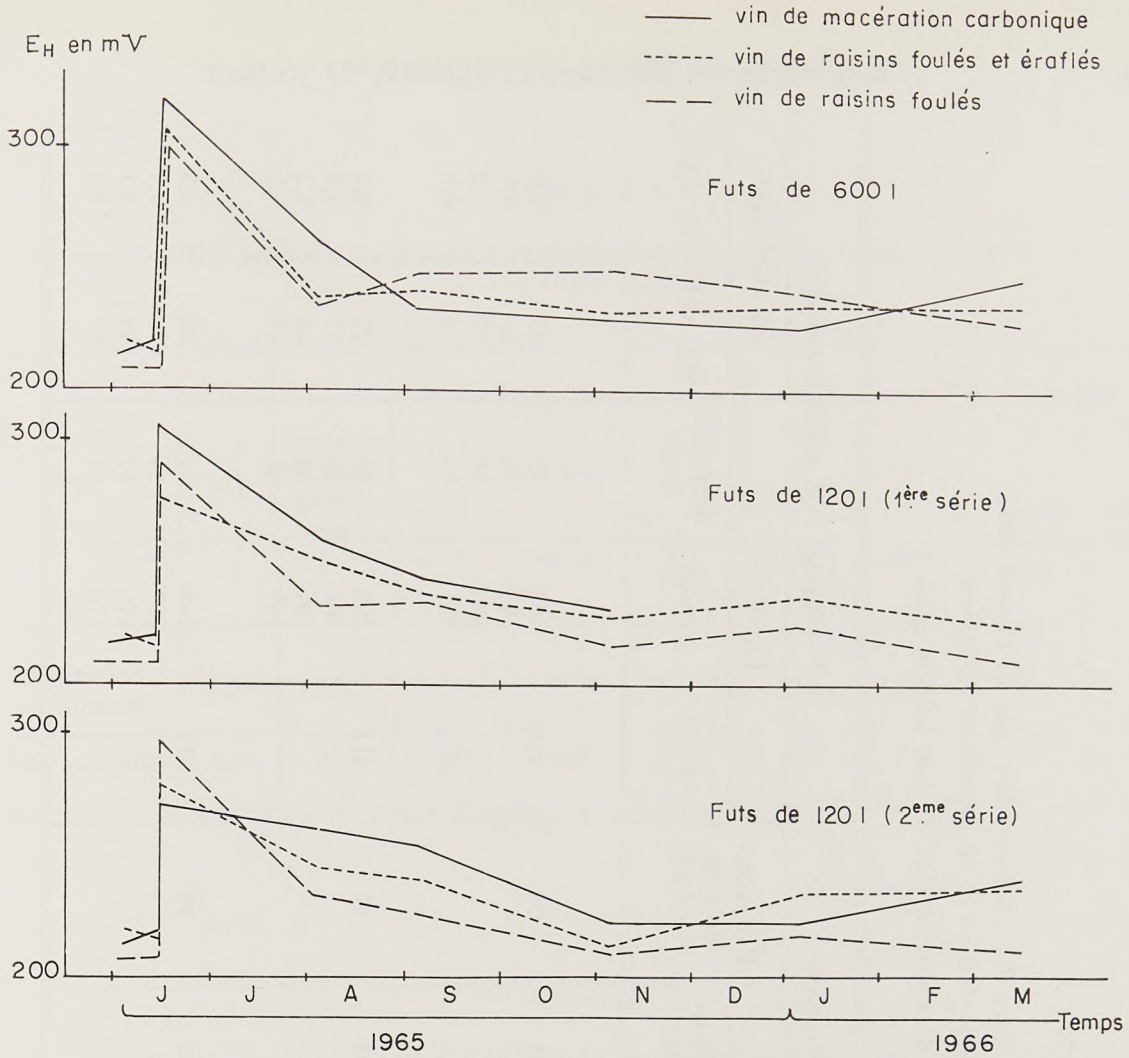


FIG. 3. — *Évolution du potentiel oxydoréducteur des vins de l'année 1964 conservés en fûts après le troisième soutirage*

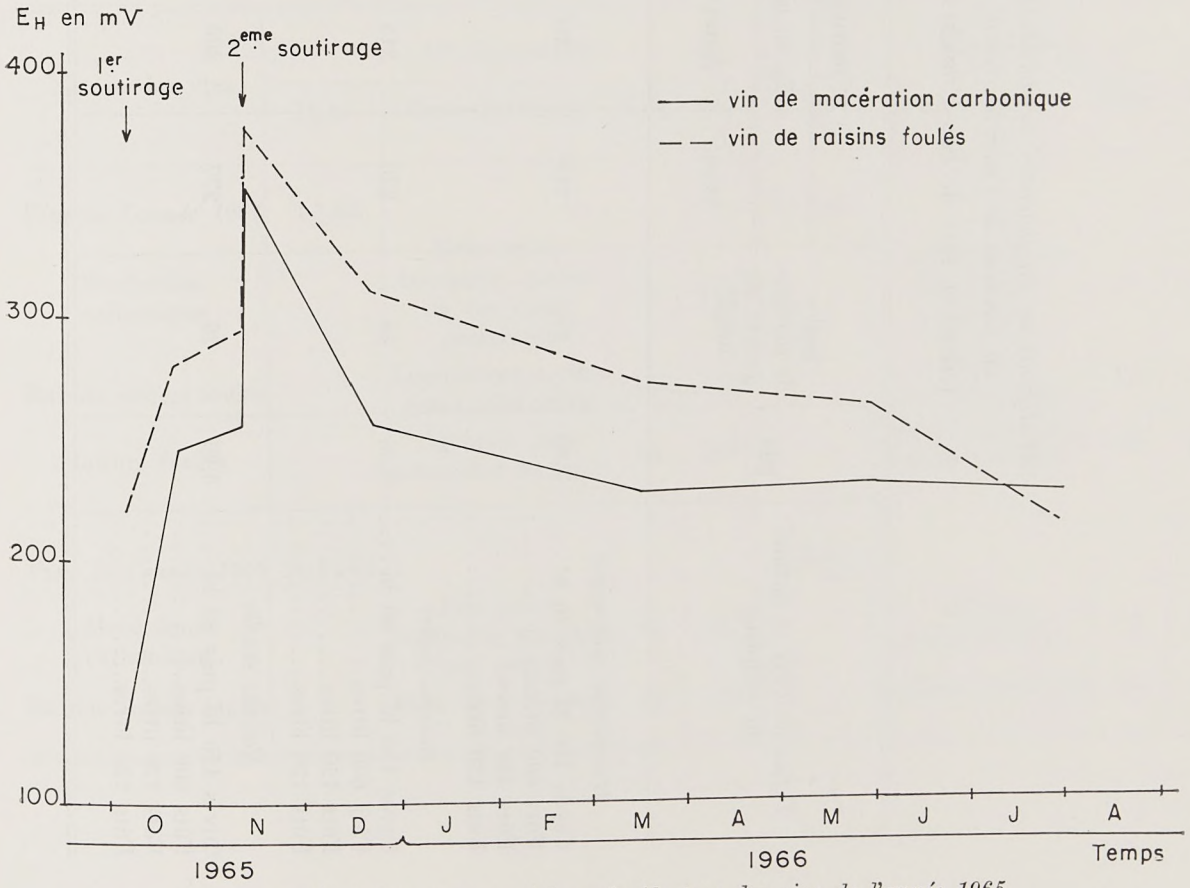


FIG. 4. — *Évolution du potentiel oxydoréducteur des vins de l'année 1965 conservés en cuves métalliques*

TABLEAU 4

Modifications du potentiel oxydoréducteur au cours des soutirages des vins de l'année 1964 en fonction de l'enrichissement en oxygène dissous et en anhydride sulfureux

(cuves et fûts de 600 l méchés à 3 g de soufre/hl, fût de 120 l à 4-5 g/hl)

Types de vins et nature du récipient	pH	Indice de permanganate en méq/l	2e soutirage avec aération				3e soutirage avec aération ménagée				
			E_H en mV			Enrichissement en SO_2 mg/l	E_H en mV			Enrichissement	
			Avant	Après	Accroissement		Avant	Après	Accroissement	SO_2 mg/l	O_2 mg/l
Macération carbonique											
Cuves 110 hl puis 80 hl	3,86	29	219	310	91	29	226	299	73	35	0,8
Fûts 600 litres.....								319	93	48	0,1
Fûts 120 litres.....								304	78	77	0,2
Fûts 120 litres.....								271	45	73	0,6
Raisins foulés											
Cuves 110 hl puis 80 hl	3,86	40	220	315	95	34	211	309	98	22	0,5
Fûts 600 litres.....								301	90	17	0,3
Fûts 120 litres.....								291	80	56	0,2
Fûts 120 litres.....								297	86	48	0,1
Raisins éraflés											
Cuves 110 hl puis 80 hl ...	3,80	26	277	300	73	30	217	269	52	33	0,3
Fûts 600 litres.....								307	90	27	0,8
Fûts 120 litres.....								274	57	78	0,1
Fûts 120 litres.....								279	62	63	0,4

TABLEAU 5

Modifications du potentiel oxydoréducteur des vins de l'année 1965 au cours des soutirages

Vin	pH	Indice de permanganate méq/l	1er soutirage sans aération			2e soutirage avec aération			
			E_H en mV			E_H en mV			O_2 en mg/l
			Avant	Après	Accroissement	Avant	Après	Accroissement	
Macération carbonique	3,70	31,5	179	192	12	254	253	99	2,6
Raisins foulés	3,50	37	287	287	0	295	379	84	4,9

TABLEAU 6

Relations entre le potentiel oxydoréducteur et les caractères organoleptiques des vins conservés en cuve

Nature des vins	1re dégustation				2e dégustation			
	Date	Caractéristiques	Note	E_H	Date	Caractéristiques	Note	E_H
Vins de l'année 1964	3-3-65				17-3-66			
Macération carbonique		Très fruité, bouqueté, qualité de vin vieux prononcée	15	247		Caratéristiques légèrement atténuées	14	220
Raisins entiers foulés		Légèrement astringeant, plus coloré	13	274		Mêmes caractéristiques	13	210
Raisins éraflés		Agréable mais manquant de corps	14	281		Couleur ternie, plat, légèrement amer	11	238
Vins de l'année 1965	24-12-65				28-5-66			
Macération carbonique		Très fruité, bouqueté, agréable, très souple	16	256		Mêmes caractéristiques	16	232
Raisins entiers foulés		Plat, sans bouquet	10	320		Qualités améliorées	12	262

Le tableau 3 met en parallèle les valeurs des potentiels et les teneurs en substances polyphénoliques des vins de goutte et de presse des essais 1965.

Les modifications du potentiel au cours des soutirages en relation avec l'enrichissement en oxygène et en anhydride sulfureux sont données dans le tableau 4 (essais 1964) et le tableau 5 (essais 1965).

Enfin le tableau 6 compare les valeurs du potentiel oxydoréducteur et les caractères organoleptiques des vins.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

1. *Influence de la technique d'élaboration du vin*

a) *Évolution du potentiel oxydoréducteur pendant la fermentation alcoolique.*

Pendant la fermentation alcoolique, les courbes représentant l'évolution du potentiel (fig. 1) des moûts des essais de 1965 ont la même allure : une baisse puis une remontée du potentiel. Elles diffèrent seulement par le décalage dans le temps du potentiel-limite qui est atteint beaucoup plus tard au cours de la vinification par macération carbonique. Dans ce cas l'évolution du potentiel est presque parallèle à celle de la densité du moût.

Parmi les facteurs qui peuvent agir sur les valeurs du potentiel le pH n'intervient pratiquement pas car les variations sont faibles (deux dixièmes d'unité pH).

Il n'en est pas de même pour la température qui est plus élevée dans la cuve de raisins entiers foulés ; ici le potentiel-limite est atteint beaucoup plus tôt. Ceci confirme les observations de Ribéreau-Gayon et Peynaud (1960).

Juste avant l'écoulage les potentiels sont identiques (225 mV) pour les moûts des deux types de vinification qui ont également une densité voisine (1 000 pour les raisins entiers foulés et 999 pour la macération carbonique).

Dans chaque essai il n'a pas été possible de déceler de traces d'oxygène dissous à l'aide de la méthode polarographique utilisée, même avant la fin du remplissage des cuves. Ce fait a déjà été observé par Chauvet et *al.* (1966) au cours de la comparaison de la vinification traditionnelle beaujolaise et de la vinification par macération carbonique.

b) *Comparaison des potentiels des vins de goutte et des vins de presse.*

Après un égouttage dans une cuve souterraine remplie de gaz carbonique, les vins de goutte ont des valeurs du potentiel plus basses que celles des moûts prélevés la veille par le robinet du bas de la cuve. Les potentiels passent en effet de 225 mV à 197 mV pour le vin de raisins entiers foulés et à 140 mV pour le vin de macération carbonique. Ceci est certainement dû au fait que les couches de moût situées au fond de la cuve ont des potentiels plus élevés que ceux du milieu (Mourgues-Deibner, 1967) ; l'écoulage entraîne une homogénéisation de l'ensemble à l'abri de l'air ce qui pourrait expliquer cette variation de potentiel.

Les vins de presse, du fait de l'aération consécutive au pressurage (passage des marcs à l'air libre, vin de presse s'écoulant du pressoir dans un conquet de récupération ouvert), possèdent des potentiels élevés, puisqu'en 1965 ils sont respectivement de :

— 370 mV pour le vin de presse de raisins entiers foulés avec 1,22 mg d'oxygène dissous ;

— 240 mV pour le vin de presse de raisins entiers non foulés avec des traces d'oxygène non dosables — le vin de presse de macération carbonique possède encore un taux relativement important de sucres (densité 1 012 à 24°C) et est l'objet d'une fermentation alcoolique rapide, ce qui expliquerait le taux plus bas du potentiel et l'absence d'oxygène.

c) *Évolution du potentiel du mélange des vins de goutte et de presse.*

Le mélange des vins de goutte et de presse détermine pour chaque type de vinification une baisse de potentiel redox qui passe successivement :

— de 234 mV à 112 mV en un jour pour les vins de raisins entiers foulés,

— de 225 mV à 88 mV en deux jours pour le vin de macération carbonique.

Cette baisse est due vraisemblablement à la dégradation par fermentation alcoolique des quelques grammes de glucides restants (densité du vin de macération carbonique passant de 999,4 à 995,5). Celle-ci est accompagnée, toujours pour la cuve de macération carbonique, de la fermentation malolactique. En effet, on a constaté, par chromatographie sur papier des acides organiques, que la fermentation malolactique a débuté le 9-10-1965 pour se terminer le 13-10-1965. Puis l'effet réducteur des microorganismes diminuant, le potentiel remonte progressivement.

d) *Potentiels des vins de presse et des vins de goutte conservés trois mois en bouteilles d'un litre.*

Comme l'indique le tableau 3, le vin de presse de vendange foulée riche en substances polyphénoliques (exprimées en indice de permanganate) possède un potentiel plus bas que le vin de goutte correspondant. C'est l'inverse qui se produit dans le cas de la vinification par macération carbonique. Les potentiels des vins aérés pendant 15 mn dans la cellule de mesure suivent la même loi. On retrouve ainsi les constatations faites en 1964 par DEIBNER-MOURGUES.

2. *L'influence des soutirages*

D'après les tableaux 4 et 5, les soutirages avec aération déterminent une augmentation du potentiel de 73 à 99 mV avec 2,6 à 4,9 mg d'oxygène par litre ; ceux avec aération ménagée augmentent le potentiel de 45 à 98 mV avec 0,1 à 0,8 mg d'oxygène par litre. Il ressort qu'il n'y a pas de relation directe entre l'enrichissement en oxygène et l'augmentation du potentiel. La dissolution du SO_2 varie autour de 30 mg par litre dans le cas des cuves, mais est plus variable dans le cas des fûts (les récipients ne sont pas aérés après le méchage).

Le soutirage sans aération fait sur les vins de 1965 détermine très peu de modifications dans les valeurs du potentiel et les très légères augmentations de ces dernières dans le cas de vins de macération carbonique peuvent être attribuées à la montée continue du potentiel à la fin de la fermentation alcoolique.

D'après les figures 2, 3, et 4, les vins jeunes de macération carbonique ont, après fermentation, les potentiels les plus bas.

Après le deuxième soutirage, les potentiels des vins de macération carbonique diminuent rapidement, ils restent inférieurs aux autres types de vin, la différence

s'atténuant avec le temps de conservation. Il y a même une inversion qui se produit au cours de l'été aussi bien sur les vins de 1964 que de 1965.

Remarquons que le vin issu de vendange éraflée possède après le deuxième soutirage le potentiel le plus bas ; ces mêmes différences se retrouvent sur les potentiels des vins aérés pendant 15 mn dans la cellule de mesure (334 mV pour le vin de raisins éraflés, 349 mV pour les autres types de vin). Puis les valeurs du potentiel de ce vin diminuent relativement moins vite et deviennent plus élevées que les autres.

Au cours du troisième soutirage (vins de 1964) le potentiel des vins de macération carbonique diminue moins vite que les autres et garde longtemps une valeur élevée comme si le pouvoir réducteur de ce type de vin s'atténuait plus rapidement que les autres en fonction du temps de conservation.

Les vins de vendange foulée possèdent après soutirage des potentiels inférieurs à ceux des autres types de vin.

3. *Influence des récipients*

Si l'on compare les valeurs du potentiel des vins contenus dans les divers récipients à la fin de l'expérimentation, on note les résultats moyens suivants :

— 196 mV pour les vins en bouteilles (deux bouteilles pour chaque type de vinification),

— 227 mV pour les vins conservés en fûts de 120 l,

— 235 mV pour les vins conservés en fûts de 600 l,

— 223 mV pour les vins conservés en cuves de 80 hl.

Notons que KOTCHERGA (cité par DEIBNER, 1957 *d*) trouve des différences plus marquées entre les vins contenus dans les bouteilles (150-280 mV) et les vins conservés en fûts (360-410 mV).

4. *Corrélation entre le potentiel et les caractères organoleptiques des vins*

Pour les essais de 1965, le tableau 6 indique que les vins jeunes de macération carbonique qui sont les mieux classés, possèdent les potentiels redox les plus bas; cette relation n'est plus respectée pour les vins plus âgés.

Pour les vins de 1964, conservés dans divers récipients, les vins en fûts ont été les plus appréciés bien qu'ils possèdent les potentiels redox les plus élevés ; les vins en bouteilles, au potentiel le plus faible, ont été classés gustativement avant les échantillons en cuves mais après ceux en fûts.

S'il existe un rapport entre le potentiel d'oxydoréduction et les qualités organoleptiques des vins, celui-ci n'est pas simple. Les caractères gustatifs des vins sont la résultante de très nombreux facteurs et de réactions complexes pour lesquels la valeur du potentiel redox doit jouer certainement un rôle important qu'il reste cependant à préciser.

CONCLUSIONS

Il serait hasardeux de donner à ce travail une généralisation trop importante, néanmoins un certain nombre de points sur l'évolution du potentiel d'oxydoréduction des vins rouges aux divers stades de leur élaboration peuvent être retenus.

1. Au cours de l'élaboration des vins, les différences dans l'évolution du potentiel oxydoréducteur proviennent du fait que la fermentation a lieu plus rapidement dans le cas de la vinification de raisins entiers foulés que dans le cas de la vinification par macération carbonique ; le potentiel-limite est atteint plus rapidement dans le premier cas que dans l'autre.

Par contre, après le décuvage et le pressurage, la fin de la fermentation alcoolique étant très rapide pour les vins de macération carbonique et la fermentation malolactique se déroulant au même moment, le potentiel atteint est très bas (86 mV).

En outre, l'absence d'oxygène libre dans les moûts au cours de la cuvaison a été confirmée pour les deux types de vinification.

2. Un soutirage avec aération entraîne une augmentation de 73 à 99 mV pour une absorption d'oxygène allant de 2,6 à 4,9 mg/l.

Un soutirage sous gaz carbonique n'entraîne pas de modifications notables du potentiel.

3. Au cours de la conservation des vins, les vins jeunes de macération carbonique ont, pendant les essais menés au cours de deux années consécutives, des potentiels plus bas que ceux produits avec des raisins foulés, éraflés ou non éraflés. Puis ces différences diminuent progressivement et il y a même une inversion.

4. La nature du récipient influe sur l'établissement des valeurs limites du potentiel qui sont plus basses dans le cas des vins conservés en bouteilles que dans le cas des cuves et surtout des fûts.

5. La relation qui existe entre le potentiel et les caractéristiques organoleptiques des vins est surtout valable dans le cas des vins jeunes : le vin de macération carbonique, arrivant à la plénitude de ses qualités beaucoup plus tôt que les autres types de vins, possède le potentiel le plus bas. Cette relation n'est pas toujours très nette et est parfois contradictoire, d'autres facteurs jouant un rôle très important ; c'est ainsi que le vin de presse de vendange foulée a un potentiel redox bien plus bas que le vin de goutte correspondant, alors qu'il ne possède pas les mêmes qualités gustatives.

Les résultats acquis peuvent conduire à des applications technologiques comme le contrôle des soutirages ; des essais de soutirage sous gaz carbonique et sous différents gaz inertes sont actuellement en cours, notamment pour les vins blancs qui sont plus sensibles à l'oxydation.

En outre, la connaissance du potentiel redox est très utile pour l'étude de la maturation et du vieillissement des vins rouges. Il conviendrait alors de compléter cette mesure physique par la connaissance d'autres éléments majeurs des vins, substances polyphénoliques, aromatiques, oligoéléments par exemple.

Cette étude analytique parallèle permettrait de mieux comprendre la valeur indicative du potentiel, résultante de facteurs complexes et son influence vis à vis des réactions indispensables à une maturation correcte des vins.

Reçu pour publication en novembre 1967.

SUMMARY

TECHNIQUES OF RED WINE MAKING AND REDOX POTENTIAL

Observations made in 1965 and 1966 on changes in the potential during the production and conservation of red wines have led to the following conclusions :

1. since alcoholic fermentation is faster when the processing of whole grapes is by crushing than when it is by carbonic maceration, the limit potential is reached sooner in a crushed grapes. Moreover, there is no free oxygen present;

2. drawing off with aeration causes an increase of 73 to 99 mV for an absorption of 2.6 to 4.9 mg of oxygen per litre in the experimental wines. Drawing off without aeration in a tank filled with carbon dioxide modifies the potential very little;

3. the young wines from carbonic maceration have lower potentials than those from crushed vintages and desintegrated vintages. A relationship seems to exist between their state of maturity and their organoleptic characteristics;

4. the potential of wines kept in vats is above that of wines kept in bottles but below that of wines kept in casks.

RESUMEN

TÉCNICAS DE VINIFICACIÓN EN TINTO Y POTENCIAL OXIDOREDUCTOR

Las observaciones efectuadas durante los años 1965 y 1966 acerca de la evolución del potencial durante el transcurso de la elavoración y la conservación de los vinos tintos, han permitido llegar a as conclusiones siguientes :

1. siendo la fermentación alcohólica más rápida en el caso de vinificación de uvas enteras estrijadas que en el caso de vinificación por maceración carbónica, el potencial límite es alcanzado en un lapso de tiempo más corto en el primer caso que en el segundo. Además, se ha visto confirmada la ausencia de oxígeno libre;

2. un trasiego con ventilación provoca en los vinos experimentados un aumento de 73 a 99 mV para una absorción de 2,6 à 4,9 mg de oxígeno por litro. Un trasiego sin ventilación, en una cuba llena de gas carbónico únicamente modifica el potencial en reducidas proporciones;

3. los vinos tempranos de maceración carbónica tienen potenciales más bajos que aquellos procedentes de vendimia estrujada y de vendimia despalillada. Parece existir una relación entre su estado de madurez y sus características organolépticas;

4. los vinos conservados en botella presentan potenciales más bajos que aquellos conservados en barrica, siendo a su vez intermedio el potencial de los vinos conservados en cubas.

RIASSUNTO

TECHNICHE DI VINIFICAZIONE IN ROSSO E POTENZIALE DI OSSIDORIDUZIONE

Le osservazioni fatte nel 1965 e nel 1966 sull'evoluzione del potenziale nel corso dell'alebobrazione e della conservazione dei vini rossi hanno approdato alle conclusioni seguenti :

1. nel caso di vinificazione delle uve intere pigiate la fermentazione alcolica essendo più rapida che nel caso della vinificazione con macerazione carbonica, il potenziale limite è raggiunto in un tempo più corto nel primo caso che nel secondo. Inoltre l'assenza di ossigeno libero è stata confermata;

2. un travasamento con aerazione provoca nei vini sperimentati un aumento di 73 a 99 mV per un assorbimento di ossigeno di 2,6 à 4,9 mg/l. Un travasamento senza aerazione in un tino riempito di anidride carbonica modifica soltanto pochissimo il potenziale;

3. i vini giovani provenienti da macerazione carbonica presentano potenziali più bassi di quegli dei vini provenienti da vendemmie pigiate e da vendemmie diraspate. Una relazione sembra esistere fra il loro stato di maturità e i loro caratteri organolettici;

4. i vini conservati in bottiglia hanno potenziali più bassi di quegli nei barili, il potenziali dei vini conservati nei tini essendo intermediario.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BÉNARD P., JOURET C., 1962. Essai de vinification : comparaison entre trois techniques de vinification en rouge : raisins entiers et foulés, raisins foulés et éraflés, raisins entiers non foulés. *Vignes et Vins* n° 108, 25-29, n° 109, 7-11.

BÉNARD P., JOURET C., 1963. Essais comparatifs de vinification en rouge. *Ann. Technol. agric.*, **12**, (2), 85-102.

CHAUVET J., BRÉCHOT P., CROSON M., IRRMANN R., 1966. Étude de la croissance anaérobie des levures au cours de vinification par macération de raisins entiers. *Ann. Technol. agric.*, **15** (1), 99-111.

DEIBNER L., 1957. *a*) Modifications du potentiel oxydoréducteur au cours de l'élaboration des vins de différents types. *Ann. Technol. agric.*, **5**, 313-345. *b*) Évolution du potentiel oxydoréducteur au cours de la maturation des vins. *Ann. Technol. agric.*, **6**, 346-362. *c*) Effet de différents traitements sur le potentiel oxydoréducteur des vins au cours de leur conservation. *Ann. Technol. agric.*, **6**, 363-373. *d*) Potentiel oxydoréducteur des vins : son importance, sa signification, tendances actuelles de la technique de sa mesure. *Industr. aliment. agric.*, **74** (4), 273-283.

DEIBNER L., 1966. Sur les particularités de mesure du potentiel oxydoréducteur des jus de raisins et des vins. *Bull. off. internation. Vigne, Vin*, **39** (421), 312-326.

DEIBNER L., BÉNARD P., 1955. Dosage de l'anhydride sulfureux total et de l'ion sulfurique dans les liquides organiques. Application aux vins, aux jus de raisin et aux solutions de sucre cristallisé. *Industr. aliment. agric.*, **72** (9-10), 565 (11), 673.

DEIBNER L., MOURGUES J., 1964. Potentiel oxydoréducteur de quelques vins, *Industr. aliment. agric.*, **81**, 1075-1080.

DEIBNER L., MOURGUES J., 1966. *a*) Sur la polarisation des électrodes de platine destinées à la mesure du potentiel oxydoréducteur pendant leur séjour prolongé dans les vins rouges et les moûts de raisin en fermentation alcoolique. *C. R. Acad. Sci.*, **263**, Série D, 1333-1336. *b*) Sur les caractéristiques des électrodes de platine destinées à la mesure du potentiel oxydoréducteur des jus de raisin et des vins. *Bull. off. internation. Vigne, Vin*, **37** (425-426), 992-932.

FERENCZI S., 1961-1962. Les variations de la valeur du rH au cours de la fermentation, de l'enchantelage et du traitement des vins de la région de Tokakjhegyalja (en français). *Acta agron. Acad. sci. hungar*, **11** (3-4). 240-264

MOURGUES J., DEIBNER L., 1967. Sur l'inégalité des valeurs du potentiel oxydoréducteur déterminé dans les différentes couches des vins et des moûts de raisin en fermentation alcoolique. *Industr. aliment. agric.* (à paraître).

RIBÉREAU-GAYON J., MAURIE A., 1942. Les composés phénoliques du vin (matières colorantes et tannoïdes) *Bull. off. internation. Vigne Vin*, **15** (150), 60-76.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1960. *Traité d'Œnologie*, **1**, 335-339. Ch. Béranger, Paris-Liège.

VETCHER A., FILINE-KOLDAKOV B., 1958. Dosage polarographique de l'oxygène dissous dans le vin (en russe). *Bull. Éc. sup. U. R. S. S., Ind. Alim.* (3), 141-144.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (4), 349-355.

LE DOSAGE DES FLAVONOLS DU VIN ET DES EXTRAITS DE RAISIN

M. BOURZEIX

avec la collaboration technique de N. HÉRÉDIA

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, - 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Les recherches effectuées jusqu'à présent sur les flavonols du raisin et du vin ont été orientées principalement vers l'identification de ces polyphénols et leur localisation dans la baie. Une première tentative d'évaluation a cependant été faite en 1964 ; elle était fondée sur l'appréciation visuelle de l'intensité des taches chromatographiques.

Le présent mémoire propose une solution pratique aux problèmes de l'isolement quantitatif et du dosage des flavonols des extraits de raisin et des vins. Il est le complément de la publication parue en 1966 (BOURZEIX M.), relative à la séparation de ces colorants jaunes par chromatographie sur couche mince de cellulose.

INTRODUCTION

Une mise au point sur les flavonols du raisin et du vin a paru en 1964 (RIBÉREAU-GAYON P.). Les quelques recherches effectuées jusque là montrent que les raisins et les vins, rouges et blancs, peuvent contenir plusieurs flavonols comprenant le quercétol, le myricétol, le kaempférol et plusieurs de leurs glucosides.

Les travaux de P. RIBÉREAU-GAYON relatés dans cette mise au point sont axés sur l'identification et la localisation de ces colorants jaunes dans les raisins de six cépages, trois rouges et trois blancs ; mais ils constituent aussi une première tentative d'évaluation puisqu'on a cherché à établir les pourcentages des différents flavonols par appréciation visuelle de l'intensité des taches sur les feuilles de papier chromatographique. L'utilisation de cette méthode d'évaluation a conduit son auteur à conclure : « la concentration des flavonols dans les vins rouges est de l'ordre de 15 mg/l » et : « dans les vins blancs dont la préparation ne comporte pas de macération de pellicules et des autres parties de la grappe dans lesquelles sont localisés les composés phénoliques, les flavonols sont soit absents, soit présents à l'état de traces

et on peut affirmer avec HENNIG et BURKHARDT (1960) que ces corps ne participent pas à la coloration des vins blancs, comme on l'admet généralement. »

En fait, le problème de l'isolement rapide des flavonols du vin en quantité suffisante pour permettre une mesure et celui de leur dosage ne sont pas résolus.

En 1966, l'isolement quantitatif des flavonols du raisin et du vin a fait l'objet d'un travail qui a abouti à proposer une technique fondée sur la chromatographie directe sur couche mince de cellulose d'une quantité suffisante de vin (BOURZEIX, BANIOL). Il restait d'une part à compléter l'isolement quantitatif en précisant les modalités de l'élution des flavonols à partir de la poudre de cellulose de la couche mince, et d'autre part, à choisir une méthode pratique de dosage de ces colorants dans l'éluat obtenu.

Ces deux points ont fait l'objet de recherches récentes dont les résultats sont exposés dans le présent mémoire.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

La technique proposée en 1966 (M BOURZEIX., P BANIOL.) permet de séparer chromatographiquement les flavonols, Elle conduit en outre. simultanément, à une nette séparation entre flavonols aglucones et flavonols glucosides et même entre flavonols pris individuellement. Il convient de signaler que le myricétol, flavonol aglucone qui n'avait pas été expérimenté au cours de la mise au point de ce mode opératoire, se comporte comme les autres flavonols aglucones : il ne migre pas au cours du premier développement alors qu'il est entraîné par le deuxième solvant, dans la direction perpendiculaire. Il s'ensuit que la tache correspondante est sensiblement alignée sur celle des deux autres aglucones (quercétol et kaempférol). Ses Rf sont 0,06 dans la première dimension et 0,40 dans la seconde. A la lumière ultraviolette cette tache est fluorescente en jaune, comme celle du quercétol et du kaempférol, alors que les taches des flavonols glucosides apparaissent en brun sombre.

Notons que certains constituants incolores, responsables de fluorescences bleues à la lumière ultraviolette, sont isolés en même temps que les flavonols. Ces composés, vraisemblablement des acides phénols, n'interfèrent pas dans les opérations ultérieures de dosage.

1. *Élution des flavonols*

Après le séchage consécutif au deuxième développement, on prélève par grattage toute la partie de la couche mince qui correspond aux taches de flavonols repérées à l'aide de la lumière ultraviolette. Il est préférable de maintenir la plaque horizontale pendant cette opération de façon à pouvoir broyer finement les agglomérats de poudre avant d'introduire celle-ci dans le tube d'un entonnoir pour l'élution. Les dimensions du tube des entonnoirs utilisés au cours de ces essais sont : longueur 150 mm, diamètre intérieur 15 mm.

L'extrémité inférieure des tubes est préalablement garnie d'un bouchon de coton de verre hyperfin. Une fois en place ce filtre de coton est lavé par du méthanol RP, puis séché à température ambiante. On introduit alors la poudre par petites portions en tapotant chaque fois sur le tube pour assurer un tassement homogène. Cette opération terminée, on élue par du méthanol RP, puis par de l'eau distillée. L'éluat est recueilli dans un ballon jaugé de 25 ml. Lorsqu'on a obtenu deux ou trois millilitres, on introduit un agitateur dans la colonne de poudre de façon à détruite les canaux d'écoulement qui auraient pu se former. Cette homogénéisation faite, l'élution se poursuit.

2. *Dosage des flavonols totaux*

Diverses méthodes de dosage des flavonols rencontrés chez les végétaux ont été proposées.

— En 1947, PORTER, BRICE, COPELY et COUGH ont proposé une technique de dosage spectrophotométrique du quercétol en solution alcoolique. La formation de complexe entre ce flavonol et l'aluminium a été préconisée en vue du dosage, en 1951 par DILLAHA, GAGE, WENDER et par NAGHASKI, FENSKE, COUCH ; en 1952 par HÖRHAMMER, HÄNSEL ; en 1958 par HAGEDORN, NEU. Ces divers modes

opératoires éprouvés par DODD (1959) ont conduit à des résultats incorrects. Ce dernier a examiné les causes de variabilité de ces résultats et étudié les conditions optima de la formation du complexe entre le quercétol et l'aluminium. La même année ROMISCH a fait une étude analogue en partant de la rutine (rhamnoglucoside du quercétol). En opérant en présence de pyridine, à pH 5,6 celui-ci obtient une densité optique trois fois supérieure à celle observée dans les conditions de DODD. Notre choix s'est donc porté sur la méthode de ROMISCH.

Le principe de cette méthode consiste dans la mesure de l'exaltation de l'absorption due à la formation d'un complexe avec le chlorure d'aluminium. Il convient donc, pour chaque mesure, de disposer d'un témoin contenant les mêmes flavonols, à la même concentration. Ceci oblige à faire en double la chromatographie sur couche mince du vin ou de l'extrait étudié. Ce témoin doit contenir aussi les mêmes réactifs (acide acétique, pyridine) , le chlorure d'aluminium excepté.

L'expérience montre qu'il est nécessaire de partir d'environ 600 microlitres de vin pour obtenir une exaltation convenable de la densité optique (dans l'échelle 0,020-0,200) ; il est nécessaire de préparer quatre plaques pour chaque dosage (à raison de 300 ul par plaque), deux de celles-ci étant destinées au témoin.

Les flavonols sont élués par 5 ml de méthanol RP. Cette élution est complétée par addition d'eau distillée. Dans le cas des flavonols destinés au témoin on porte la quantité de méthanol d'élution à 7,5 ml pour compenser les 2,5 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium ajoutés ultérieurement à l'autre éluat.

Il a donc été nécessaire d'adapter légèrement le mode opératoire décrit par ROMISCH. D'après celui-ci on part en effet de 2 ml de solution méthanolique de rutine ; or les deux premiers millilitres d'éluat ne contiennent généralement pas la totalité des flavonols contenus dans la poudre grattée. Par contre cinq millilitres de méthanol suffisent largement pour éluer la totalité des flavonols. Le passage du volume de solution méthanolique des flavonols à doser de 2 ml à 5 ml n'entraîne qu'une diminution légère de l'exaltation.

Finalement le mode opératoire adopté se résume comme suit :

A 10 ml d'éluat méthanolique, puis aqueux, contenus dans le ballon de 25 ml on ajoute successivement :

— 0,6 ml d'acide acétique RP,

— 10 ml de pyridine à 20 p. 100 (20 ml de pyridine + 80 ml d'eau),

— 2,5 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium (12,072 g de $Cl^3Al, 6H_2O$ dans le méthanol RP, q. s. p. 100 ml),

— de l'eau distillée, q. s. p. 25 ml.

Après agitation on filtre (petit filtre de 11 cm de rayon, PROLABO, bleu, sans cendres).

Le but étant de doser les flavonols totaux, il convenait d'expérimenter la méthode à partir des divers flavonols susceptibles de se trouver dans le vin. Les principaux d'entre eux : le quercétol, le myricétol, le kaempférol (tous trois aglucones) et certains de leurs dérivés glucosidiques comme la quercitrine (3-glucoside du quercétol), la rutine (3 rhamnoglucoside du quercétol) se trouvent dans le commerce. FLUKA AG (Buchs SG, Suisse) livre à un degré de pureté élevé (*PURISS*) le kaempférol, le quercétol, la rutine et à un degré de pureté relativement élevé (*PURUM* 97 p. 100) la quercitrine. Le myricétol commercial est moins pur (*PRACT*). En France, SERLABO (26, avenue Saint-Gilles, Paris 3e) livre le quercétol et la quercitrine à l'état pur.

Pour chacun de ces flavonols, on a déterminé :

1° Le profil de la courbe représentant la variation de l'exaltation de l'absorption entre 380 et 500 mμ de façon à déterminer le *MAXIMUM D'ABSORPTION*.

2° La *gamme* d'exaltations correspondant aux concentrations de $0,5.10^{-4}$, 1.10^{-4}, 2.10^{-4} 3.10^{-4} et 5.10^{-4} molécule gramme par litre de méthanol, au maximum d'adsorption et autour de celui-ci.

RÉSULTATS

Les maxima d'exaltation se situent aux longueurs d'ondes de :

426 à 430	millimicrons	dans le cas	du quercétol
438 à 446	—	—	du myricétol
414 à 416	—	—	du kaempférol
420 à 422	—	—	de la quercitrine
424 à 428	—	—	de la rutine

Les densités optiques correspondant aux exaltations obtenues à partir de chacun des flavonols en solution dans le méthanol aux concentrations de $0,5.10^{-4}$, 1.10^{-4}, 2.10^{-4}, 3.10^{-4} et 4.10^{-4} mol. g/litre ont été mesurées aux longueurs d'onde de 414, 416, 418... jusqu'à 446 millimicrons.

On obtient des droites : l'exaltation est proportionnelle à la concentration du flavonol.

La comparaison des droites obtenues à partir des divers flavonols expérimentés montre que celles qui correspondent aux mesures d'exaltation de densité optique à 430 millimicrons coïncident, comme le montre le tableau 1.

TABLEAU I

Mesure de l'exaltation des densités optiques, due à la formation d'un complexe flavonol-aluminium obtenu selon le mode opératoire de ROMISCH *modifié*

Longueur d'onde : 430 millimicrons
Cuves de 2 cm

	$0,5.10^{-4}$ molg/ l	1.10^{-4} mol g/l	2.10^{-4} mol g /l	3.10^{-4} mol g/l	4.10^{-4} mol g/l
Quercétol		0,067	0,143		0,281
Myricétol		0,060	0,132	0,198	0,278
Kaempférol	0,037	0,069	0,135	0,198	0,260
Quercitrine	0,040	0,072	0,137	0,204	0,275
Rutine.....	0,038	0,068	0,137	0,206	0,278
Densités optiques moy....	0,038 5	0,067	0,136	0,201	0,275

En d'autres termes, en formant le complexe selon le mode opératoire adopté, l'exaltation de la densité optique à 430 mμ est indépendante de la nature du flavonol. Elle est proportionnelle à la concentration moléculaire pour des valeurs de celle-ci pouvant atteindre 4.10^{-4} mol. g/l. On peut donc doser par cette méthode un mélange de quercétol, myricétol, kaempférol, quercitrine, rutine. Les autres flavonols ne sont pas livrés par le commerce, pour cette raison il n'a pas été possible de les tester.

Précision des résultats. Influence de l'état des réactifs

Les résultats des mesures obtenus à partir d'une solution contenant une quantité connue de rutine varient de moins de 4 mg/l autour de cette quantité. Si l'on se reporte aux résultats reproduits dans le tableau 2, l'erreur relative varie de 4 à 10 p. 100.

Par ailleurs les résultats sont les mêmes si on utilise du chlorure d'aluminium fraîchement livré ou, au contraire, livré depuis plusieurs mois. Le fait de sécher ou de ne pas sécher ce chlorure sous vide à température ambiante (pendant 5 h) n'influe pas sur le résultat.

De même on obtient une exaltation identique de la densité optique en employant de la pyridine fraîchement distillée ou au contraire de la pyridine commerciale telle quelle.

Applications

Cette méthode a été utilisée au cours de recherches à caractère technologique telles que l'étude de l'influence de la durée et de la température sur la diffusion des flavonols dans la partie liquide du raisin au cours de la macération, de l'influence du chauffage de la vendange, du mode de vinification, de la durée de conservation, sur la teneur du vin en flavonols. Les résultats feront l'objet de publications particulières.

Nous donnons à titre indicatif, dans le tableau 2 les résultats des dosages effectués sur des vins de l'année (1966) obtenus à partir de cépages rouges et blancs, cultivés dans le Midi de la France.

TABLEAU 2

Teneur des vins en flavonols totaux

(Vendanges 1966. Domaine expérimental I. N. R. A. de Pech-Rouge à Gruissan, Aude)

		Teneurs en flavonols totaux exprimés en mg de rutine par litre	Observations
Cépages rouges	*Aramon*.....	97 mg/l	Micro-vinifications avec éraflage et foulage sans SO_2
	Cinsault	97 mg/l	
	Grenache	37 mg/l	
	Morastel-Bouschet.....	52 mg/l	
Cépages blancs	*Terret*	46 mg/l	Cuvaisons de 7 jours
	S. V. 12375.....	44 mg/l	

CONCLUSION

La chromatographie sur couche mince de cellulose peut être utilisée pour isoler d'une manière rapide et commode les flavonols du vin. Après élution il est possible d'aborder le dosage global de ces flavonols. A cette fin on forme un complexe avec le chlorure d'aluminium. L'exaltation de la densité optique qui en résulte (à 430 mμ) est proportionnelle à la concentration moléculaire et indépendante de la nature des flavonols.

Le mode opératoire mis au point permet de mesurer la teneur en flavonols des vins à $\pm$ 4 mg/l (la rutine étant prise comme étalon).

L'application de la méthode à quelques vins de l'année (issus de vendange éraflées) montre que leur teneur en flavonols varie de 37 à 97 mg/l.

Reçu pour publication en octobre 1967.

SUMMARY

DETERMINATION OF FLAVONOLS IN WINE AND GRAPE EXTRACTS

The present paper complements a publication which appeared in 1966 concerning the separation of flavonols from wine by direct two-dimensional chromatography on a thin layer of cellulose.

Means of eluting these colorants from the powder obtained by scraping the thin layer and of determining them in their entirety by spectrophotometry are given in detail. This determination is based on the measurement at 430 mμ of the increase in the optical density due to the formation of a complex between the flavonols and aluminium. Under the conditions specified, the increase is proportional to the number of gram-moles of flavonol per litre of wine, and is independent of the nature of the flavonols.

Rutine is taken as the standard. The precision of the results is ± 4 mg rutine per litre.

The application of the method to some of the year's wines (the products of a *vendanges* shows that their flavonol content varies from 37 to 97 mg/l.

RESUMEN

LA DOSIFICACION DE LOS FLAVONOLES DEL VINO Y DE LOS EXTRACTOS DE UVA

El presente informe constituye el complemento de una publicación reproducida en 1966, relacionada con la separación de los flavonoles del vino por cromatografia directe bidimensional sobre capa fina de celulosa.

Se precisan actualmente las modalidades de la elutriación de estos colorantes a partir del polvo obtenido por raspadura de la capa fina, asi como aquellas de su dosificación global por espectrofotometria.

Esta dosificación se funda en la media, a 430 mμ, del mejoramiento de la densidad óptica debido a la formación de un complejo entre los flavonoles y el aluminio. En las condiciones precisadas, este mejoramiento es proporcional al número de moléculas-gramos de flavonoles por litro de vino e independiente de la naturaleza de los flavonoles.

La rutina es tomada aqui como patrón. La presición de los resultados es de 4 mg de rutina por litro.

La aplicación del método a algunos vinos del año (procedentes de vendimias despalilladas) demuestra que su contenido en flavonoles varia de 37 a 97 mg/l.

RIASSUNTO

DOSAGGIO DEI FLAVONOLI DEL VINO E DEGGLI ESTRATTI DI UVA

Questo lavoro è il complemento di una publicazione del 1966, sulla separazione dei flavonoli del vino per cromatografia diretta bidimensionale su strato sottile di cellulosa.

Sono precisate adesso le modalità dell' estrazione di questi coloranti dalla polvera ottenuta raschiando lo strato sottile, e il loro dosaggio globale per spettrofotometria.

Questo dosaggio consiste nella misura a 430 mμ, dell'aumento della estinzione dovuta alla formazione di un complesso traiflavonoli e l'alluminio, questo aumento è proporzionale al numero di molecole grammi di flavonoli per litro di vino e indipendente della natura dei flavonoli.

Abbiamo preso la rutina come Campione. La precisione è di ± 4 mg/l di rutina.

L'applicazione del metodo ad alcuni vini dell'anno (provenienti da vendemmie diraspate) fa vedere che in questi vini sono presenti 37 a 97 mg/l di flavonoli.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOURZEIX M., BANIOL P., 1966. L'isolement des flavonols du vin par chromatographie sur couche mince de cellulose. *Ann. Technol. agric.*, **15**, n° 1 2, 211-217.

DILLAHA J., GAGE T. B., WENDER S. H., 1951. Quantitative paper Chromatography of certain flavonol aglycons. (Chromatographie quantitative sur papier appliquée à quelques flavonols aglucones). *Proc. Oklahoma Acad. Sci.*, **31**, 102-104.

DOWD L. E., 1959. Spectrophotometric determination of quercetin (Détermination spectrophotométrique du quercétol). *Anal. Chem.*, **31**, n° 7, 1184-1187.

HAGEDORN P., NEU R., 1953. Photometrische untersuchung und bestimmung von Flavonen durch Lösliche Metall-Komplexe (Recherche et dosage photométrique des flavonols, sous forme de complexe métallique soluble). *Arch. Pharm.*, **286**, 486-490.

HENNIG K., BURKHARDT, 1960. Vorkommen und Nachweis von Quercitrin und Myricitrin Trauben und Wein (La recherche et la séparation de la Quercitrine et de la Myricitrine dans les raisins et les vins). *Weinberg und Keller*, **7**, n° 1, 1-3.

HÖRHAMMER L., HÄNSEL R., 1952. Ultraviolettes licht und Skbilisierung. *Arch. Pharm.*, **285**, 438-444.

NAGHSKI J., FENSKE C. J., COUCH J. F., 1951. Use of Paper Chromatography for the Quantitative Estimation of Quercetin in Rutin (utilisation de la chromatographie sur papier pour l'estimation quantitative du Quercétol dans la Rutine). *J. amer. Pharm. Assoc.*, **40**, 613-616.

PORTER W. L., BRICE B. A., COPELY M. J., COUCH J. F., 1959. Tentative spectrophotometric method for the determination of rutin in various preparations (Essai d'une méthode spectrophotométrique pour déterminer la rutine dans diverses préparations). *U. S. Dept. Agric. and Ind. Chem.*, A. I. C. -159.

RIBEREAU-GAYON P., 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. II. — Les flavonosides et les antho cyanosides. *Ann. Physiol. vég.*, **6**, n° 3, 211-242.

RÖMISCH H., 10959. Colorimetrische Bestimmung des Rutingehalts in Planzenextrakten und Präparaten mit Alluminiumchlorid in mit Eisessig-Pyridin gepufferter Lösung (Détermination colorimétrique de la teneur en rutine des extraits de plantes et des préparations à l'aide d'une solution de chlorure d'aluminium tamponnée par l'acide acétique et la pyridine). *Pharmazie*, **15**, 33-38.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (4), 357-364.

L'ISOLEMENT ET LE DOSAGE DES FAIBLES QUANTITÉS D'ANTHOCYANES DIGLUCOSIDES DANS LES VINS ET LES JUS DE RAISIN

M. BOURZEIX

avec la collaboration technique de N. HÉRÉDIA

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

Les méthodes actuelles de différenciation des vins rouges de cépages hybrides, de ceux de cépages de *Vitis vinifera* sont fondées sur la présence exclusive d'anthocyanes diglucosides dans la plupart des cépages hybrides. Le plus répandu de ces diglucosides, celui du malvidol (ou malvoside ou malvine) est plus aisément repérable que les autres. Les diverses techniques actuelles de détection des vins d'hybrides sont fondées sur le repérage visuel de ce diglucoside ou de ses produits de dégradation. La méthode officielle, applicable seulement aux vins, utilise le fait que le malvoside donne, à la lumière ultraviolette, une fluorescence rose sur les chromatogrammes élaborés dans des conditions bien précises.

Mais ces diverses techniques conduisent souvent à des résultats contradictoires surtout lorsqu'il s'agit de vins qui contiennent de faibles quantités d'anthocyanes diglucosides, d'où la nécessité de mettre au point une méthode d'isolement convenable et de dosage suffisamment précis de l'ensemble des anthocyanes diglucosides du vin et du jus de raisin.

INTRODUCTION

Une méthode de dosage des anthocyanes diglucosides du vin a été proposée en 1964 (DEIBNER, BOURZEIX, CABIBEL-HUGUES). Son application ne présente pas de difficultés dans le cas des vins contenant plusieurs centaines de milligrammes de diglucosides par litre. Mais son seuil de sensibilité élevé (30 mg d'anthocyanes diglucosides par litre) la rend inutilisable si le vin contient de faibles quantités de ces anthocyanosides.

Dans un premier temps on a cherché à compenser le manque de sensibilité par simple augmentation de la quantité de vin déposée sur la couche mince. L'utilisation de plaques carrées de 20 cm de côté permet de déposer 500 microlitres de vin suivant une bande d'une quinzaine de centimètres (au lieu de 50 microlitres sur 2 centimètres précédemment). Mais, on a constaté que certains vins rouges contiennent des colorants non diglucosidiques responsables de légères traînées qui chevauchent les anthocyanes diglucosides. Cet inconvénient a obligé à reprendre le problème de l'isolement des anthocyanes diglucosides à partir de nouvelles bases.

L'isolement des anthocyanes diglucosides comprend leur séparation chromatographique sur couche mince de cellulose suivie de leur élution à partir de la poudre.

Les nombreux essais en chromatographie monodimensionnelle, simple ou multiple, sur couche mince de cellulose n'ont pas permis d'éliminer les traînées parasites qui parfois chevauchent les taches des diglucosides. Deux développements dans la même direction, avec deux solvants différents, sont nécessaires pour parvenir à la séparation la moins imparfaite entre les diglucosides anthocyaniques et l'ensemble des autres colorants rouges. Le meilleur résultat est obtenu à l'aide de solvants qui déplacent peu les diglucosides mais font migrer l'ensemble des autres anthocyanes et, en particulier, si on emploie successivement :

1° la solution aqueuse d'acide chlorhydrique 2 N (durée de développement : 1 heure) ;

2° le mélange méthyl-éthyl-cétone, acétone, eau, acide formique (60 vol., 20 vol., 20 vol., 2 vol.) qui est miscible.

Ce deuxième solvant doit être préparé au moins trois jours à l'avance et maintenu à la température d'utilisation, soit 20°C environ (durée de développement : 2 heures).

Après cette séparation préliminaire le problème est réduit à l'élimination de légères traînées parasites de colorants rouges : un développement chromatographique dans la direction perpendiculaire achève cette séparation. Un résultat très satisfaisant est obtenu en utilisant l'eau comme solvant (durée de développement : 50 minutes). Contrairement aux solvants précédents, celle-ci provoque la migration de l'ensemble des anthocyanes diglucosides, laissant sur place les traînées gênantes.

Pour sécher les plaques entre les développements on utilise un courant d'air à température ambiante. A la suite du premier développement, le séchage, qui doit être très complet, exige une heure. Après chacun des deux autres développements, trente minutes suffisent.

Après séchage de la plaque, il est aisé de récupérer, par grattage, la poudre qui contient l'ensemble des diglucosides. Cette poudre est versée dans le tube d'un entonnoir en verre dont l'extrémité effilée est obstruée par du coton de verre.

L'élution des anthocyanes diglucosides à partir de la cellulose se fait par de l'eau distillée. L'utilisation directe de la solution aqueuse décinormale chlorhydrique est moins satisfaisante (Deibner, Bourzeix, Cabibel-Hugues, 1964). L'éluat est reçu dans un ballon jaugé de 10 ml placé sous l'entonnoir et contenant 1 ml de solution normale aqueuse d'acide chlorhydrique. Finalement on obtient les diglucosides de 400 microlitres de vin ou de jus dans 10 ml d'une solution aqueuse décinormale d'acide chlorhydrique. Le pH de cette solution est égal à 1, valeur proche du maximum d'absorption (Patary, 1963), et ne correspondant pas à une acidité trop élevée,

Le problème du dosage des anthocyanes diglucosides nous a amené successive-

ment à déterminer le maximum d'absorption des anthocyanes diglucosides du vin. pris individuellement, et à tracer la courbe-étalon à partir des mesures de densité optique d'une gamme de solutions de malvoside (diglucoside pris comme étalon).

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Les plaques de verre sont nettoyées préalablement par action d'une poudre détergente, puis par immersion de quelques minutes dans le mélange sulfochromique et, enfin, par rinçage à l'eau distillée.

Pour l'élaboration proprement dite on utilise la poudre de cellulose *Mecherey und Nagel* M. N. 300. Pour obtenir quatre plaques de 20 cm × 20 cm, revêtues d'une couche de 0,5 mm d'épaisseur, il est nécessaire de mélanger 15 g de cette poudre à 100 ml d'eau. L'homogénéisation de la suspension à une consistance satisfaisante pour la chromatographie est faite par passage au « mixer » trois fois dix secondes.

Après séchage à température ambiante, la cellulose est lavée sur plaque par un développement « à blanc » avec le mélange : méthyl-éthyl-cétone, acétone, eau, acide formique (60 vol., 20 vol., 20 vol., 2 vol.) et séchée à l'aide d'un simple ventilateur à la température ambiante.

Sur les plaques sèches, on trace à l'aide d'un crayon un trait parallèle à un côté, à 3 cm de celui-ci. Un deuxième trait est tracé parallèlement à un côté adjacent, à 3 cm de ce dernier. L'intersection de ces deux traits figure le centre de la tache de départ.

On dépose 200 microlitres de vin par plaque. Cette dose est diminuée de moitié si le vin est très coloré ou s'il s'agit de jus de raisin. On utilise une micropipette de 100 microlitres dont on dépose le contenu en une seule affusion lente. Le séchage par un courant d'air à température ambiante doit être très complet. Le diamètre de la tache finale est d'environ trois centimètres.

Pour effectuer les développements chromatographiques, on utilise des cuves parallélipipédiques en verre (longueur : 20,5 cm, largeur : 8,5 cm, hauteur : 20,5 cm) conçues pour la migration ascendante.

Le front des solvants doit atteindre le bord supérieur de la plaque.

On peut développer simultanément quatre plaques. Pour cela 150 ml de solvant sont nécessaires. La température de la salle doit être d'environ 20°C.

Pour récupérer la poudre contenant les diglucosides, on trace le cercle qui délimite leurs taches à l'aide d'une matrice en plexiglass transparent, de 20 cm de côté. La poudre est soigneusement grattée et finement broyée à l'aide du grattoir. Elle est ensuite versée dans le tube de l'entonnoir en verre dont l'extrémité effilée est obstruée par un bouchon de coton de verre hyperfin légèrement tassé (dimensions du tube : longueur, 100 mm ; diamètre intérieur, 6 mm).

La poudre provenant des deux plaques nécessaires au dosage des anthocyanes diglucosides d'un même vin (des quatre plaques dans le cas du jus), est groupée dans un seul entonnoir. Elle est légèrement tassée en tapotant sur les parois du tube.

On élue les diglucosides par des affusions successives d'eau distillée. L'éluat est recueilli goutte à goutte dans un ballon jaugé.

L'élution est complète en moins d'une heure sans pression ni aspiration.

Pour obtenir un éluat toujours limpide, il convient de placer au-dessus du ballon jaugé un entonnoir (diamètre intérieur du tube : 7 mm), dont l'extrémité inférieure du tube est obstruée par une petite boule de coton de verre hyperfin, non tassée. Cet entonnoir-filtre est préalablement préparé de la façon suivante : on verse sur le coton de verre, placé dans le tube, 1 ml de gel de silice (1 g de gel de silice Merck, H, homogénéisé dans 100 ml d'eau) — on laisse égoutter — on lave par 5 ml d'eau, on laisse à nouveau égoutter.

Cette filtration élimine les particules de cellulose qui auraient pu être entraînées par l'éluat.

Afin de déterminer les meilleures conditions de dosage, on a tracé les courbes individuelles de cinq diglucosides, à l'aide d'un spectrophotomètre Jobin et Yvon.

Les diglucosides du delphinidol et du pétunidol expérimentés ont été extraits du vin de *S. V. 18315* par chromatographie directe sur couche mince de cellulose (20 cm × 20 cm × 0,05 cm). Une bonne séparation de ces deux anthocyanes est obtenue à l'aide du mélange *n*-butanol, acide acétique, eau (4 vol., 1 vol., 5 vol.) surtout en faisant deux développements successifs dans la même direction à l'aide de ce solvant. On élue ensuite ces diglucosides par le méthanol R.P.

Le diglucoside du cyanidol a été extrait des pétales de roses sèches (roses et rouges) et mises à macérer dans le méthanol R. P. Son isolement à partir de l'extrait est obtenu de la même façon que précédemment.

Les diglucosides du paéonidol et du malvidol sont commercialisés par Fluka (Suisse).

Les maxima d'absorption des solutions des anthocyanes diglucosides dans HCl N/10 aqueux se situent :

— entre 515 et 520 mμ pour le diglucoside du delphinidol,
— entre 520 et 525 mμ pour le diglucoside du pétunidol,
— autour de 510 mμ pour le diglucoside du cyanidol,
— entre 505 et 510 mμ pour le diglucoside du paéonidol,
— autour de 520 mμ pour le diglucoside du malvidol.

On mesurera la densité optique à 520 mμ, valeur qui correspond au maximum des trois diglucosides les plus abondants dans les vins étudiés jusqu'à présent, tout en restant proche du maximum des deux autres.

Pour la détermination de la courbe-étalon on a établi une gamme « après chromatographie » : selon la technique qui vient d'être décrite, on a fait la chromatographie de 400 microlitres de chacune des cinq solutions de malvoside contenant respectivement :

— $1{,}0 \cdot 10^{-5}$ molécule gramme de malvoside par litre de HCl N/10 (c'est-à-dire 6,91 mg/l),
— $2{,}0 \cdot 10^{-5}$ molécule gramme de malvoside par litre de HCl N/10 (c'est-à-dire 13,82 mg/l),
— $3{,}0 \cdot 10^{-5}$ molécule gramme de malvoside par litre de HCl N/10 (c'est-à-dire 20,73 mg/l),
— $4{,}0 \cdot 10^{-5}$ molécule gramme de malvoside par litre de HCl N/10 (c'est-à-dire 27,64 mg/l).

Après élution du malvoside, on obtient dans chacun des cas 10 ml de solution : soit, en volume, une dilution de 25 fois des 400 microlitres de vin de départ (dans HCl N/10). Pour la mesure des densités optiques correspondantes, à 520 mμ), on utilise des cuves spectrophotométriques en verre, de 4 cm d'épaisseur utile.

L'essai à blanc est constitué par l'éluat obtenu à partir de deux couches minces, vierges, soumises à tous les développements chromatographiques. Par rapport à une solution aqueuse décinormale d'acide chlorhydrique, la densité optique de cet éluat est très faible, de l'ordre de 0,005 ; il convient de le vérifier.

La teneur du vin ou du jus en anthocyanes diglucosides totales est exprimée en milligrammes de malvoside par litre (on peut aussi choisir la molécule gramme de malvoside comme unité). Une courbe étalon permet d'établir la correspondance entre la densité optique et la teneur en diglucosides.

RÉSULTATS

L'isolement des anthocyanes diglucosides

En opérant selon le mode opératoire établi, les anthocyanes diglucosides rencontrées dans les espèces du genre *Vitis* se séparent nettement des autres anthocyanes.

Leur Rf ont pour valeurs respectives dans la première, puis dans la seconde dimension :

0,20 et 0,13 pour le diglucoside du delphinidol ;
0,29 et 0,22 pour le diglucoside du pétunidol ;
0,25 et 0,25 pour le diglucoside du cyanidol ;
0,29 et 0,24 pour le diglucoside du malvidol ;
0,30 et 0,30 pour le diglucoside du paéonidol.

Ces diverses taches se situent à l'intérieur du cercle tracé sur la figure 1. Le centre de ce cercle a pour coordonnées 5,5 cm et 4 cm. Son rayon est de trois centimètres.

Au cours de la mise au point de cette méthode de séparation des anthocyanes diglucosides on s'est assuré du fait que seules les taches correspondantes se situent à l'intérieur du cercle (élution et chromatographies avec divers solvants, avec et sans hydrolyse préalable).

La courbe-étalon

La mesure des densités optiques, à 520 mμ, des éluats obtenus après chromatographie des solutions contenant 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; et 4,0 × 10^{-5} mol · g. de malvoside par litre d'HCl N/10 aqueux, a donné les résultats suivants :

0,5 · 10^{-5} mol · g/l : 0,021
1,0 · 10^{-5} mol · g/l : 0,041
2,0 · 10^{-5} mol · g/l : 0,096
3,0 · 10^{-5} mol · g/l : 0,130
4,0 · 10^{-5} mol · g/l : 0,184

La courbe-étalon est donc une droite passant par l'origine.

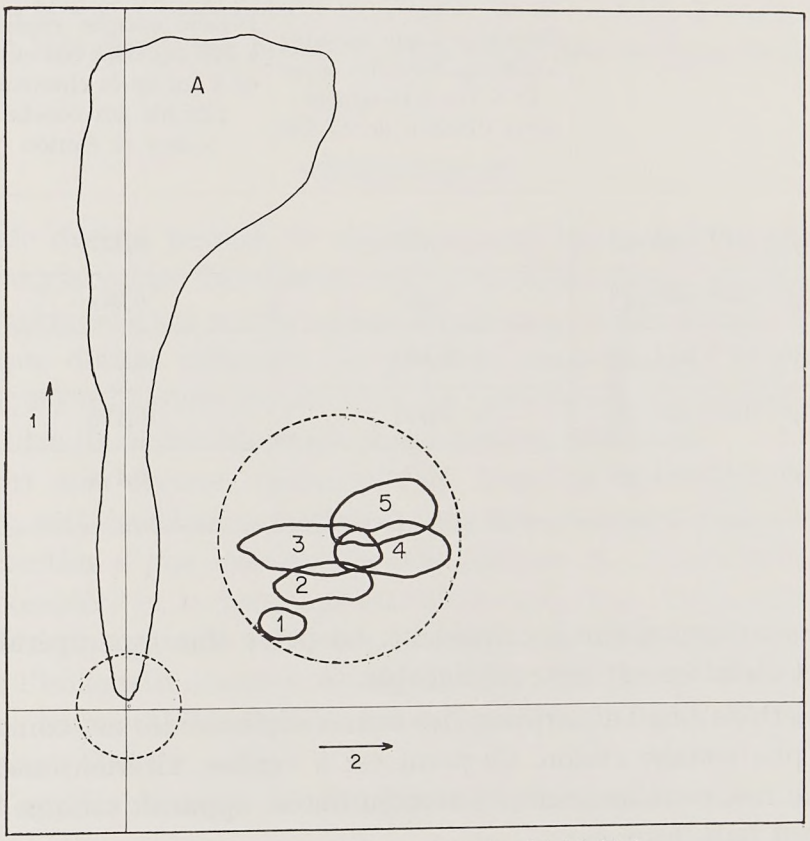


FIG. 1. : 1 : Diglucoside du delphinidol
2 : Diglucoside du pétunidol
3 : Diglucoside du cyanidol
4 : Diglucoside du malvidol
5 : Diglucoside du paéonidol
A : Anthocyanes

DISCUSSION

Au sujet de la méthode proposée, il convenait :

— d'une part, de s'assurer que les opérations de chromatographie et d'élution

qu'elle comporte n'entraînent pas de pertes plus ou moins importantes susceptibles de conduire à des résultats variables ;

— d'autre part, de déterminer la précision des résultats obtenus.

Afin de déterminer les pertes éventuelles, on a établi une comparaison entre la « gamme après chromatographie » (qui a servi à l'établissement de la courbe-étalon) et une « gamme directe ». Cette dernière a été élaborée directement par dilution de 25 fois de chacune des cinq solutions contenant 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; et 4,0 $\times$ 10^{-5} molécule-gramme de malvoside par litre de HCl N/10 aqueux. Les résultats de la mesure des densités optiques à 520 mμ des cinq solutions diluées sont groupés dans la première colonne du tableau 1. Les résultats relatifs à la « gamme après chromatographie » sont rassemblés dans la deuxième colonne.

TABLEAU I

	Densité optique mesurée à 520 mμ dans des cuves de 4 cm directement après dilution de 25 fois	Densité optique mesurée à 520 mμ dans des cuves de 4 cm après chromatographie sur couche mince et élution
$0,5 \cdot 10^{-5}$ mol. g/l	0,023	0,021
$1,0 \cdot 10^{-5}$ mol. g/l	0,047	0,041
$2,0 \cdot 10^{-5}$ mol. g/l	0,092	0,096
$3,0 \cdot 10^{-5}$ mol. g/l	0,132	0,130
$4,0 \cdot 10^{-5}$ mol. g/l	0,170	0,184

Les droites correspondantes coïncident. La perte due aux opérations de chromatographie et d'élution est donc négligeable.

Nous admettons que l'absorption des autres diglucosides est comparable à celle du malvoside pris comme étalon. Ce point est à vérifier ultérieurement. Mais dans l'état actuel de nos connaissances, le témoin choisi apparaît comme le diglucoside le plus abondant dans les vins.

Pour évaluer la précision des résultats, on a fait les deux séries de dosages suivants :

— à un vin d'*Aramon* ne contenant pas de diglucosides, on a ajouté 10^{-5} mol. g (9,91 mg) de malvoside par litre. D'après la courbe-étalon la densité optique qui correspond à cette teneur est 0,044.

Six dosages effectués sur ce mélange ont donné les densités optiques suivantes : 0,038 ; 0,051 ; 0,038 ; 0,040 ; 0,041 et 0,047. L'erreur absolue est ici de $\pm$ 0,007, soit $\pm$ 1,1 mg/l.

— Quatre dosages effectués à partir d'un autre vin contenant 3,92 mg de mal-

voside par litre ont donné les densités optiques suivantes :

0,017 *xxxx*	0,025 *xx*
0,018 *xxxx*	0,026 *xxxxx*
0,019 *x*	0,027 *xxxx*
0,020 *x*	0,028 *xx*
0,021 *x*	0,029 *xx*
0,022 *xxx*	0,032 *xxxx*
0,023 *xx*	0,033 *xx*
0,024 *xx*	0,036 *xx*

Exprimé en milligramme de malvoside/litre cela se traduit par :

$$3{,}92 \text{ mg/l} \pm 1{,}73 \text{ mg/l}$$

Exprimé en molécule gramme de malvoside par litre cela fait ;

$$0{,}057 . 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{g/l} \pm 0{,}025 . 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{g/l}$$

Dans les deux vins choisis, les teneurs en diglucosides sont très faibles (6,91 mg/l et 3,92 mg/l). L'erreur absolue étant de l'ordre de $\pm$ 2 mg/l, il s'ensuit que l'erreur relative devient très élevée (30 p. 100 et 43 p. 100) ; cela souligne la limite de la méthode.

CONCLUSION

La méthode décrite permet de séparer quantitativement les petites quantités d'anthocyanes diglucosides des vins et des jus de raisin rouges par chromatographie directe bidimensionnelle sur couche mince de cellulose. Après élution, le dosage spectrophotométrique de ces colorants est possible même lorsque leur teneur est de l'ordre de quelques milligrammes par litre. La précision du dosage est de $\pm$ 2 mg de malvoside par litre (le malvoside étant choisi comme référence).

Par rapport aux diverses techniques de détection des diglucosides proposées jusqu'à présent, cette méthode constitue un progrès à un quadruple point de vue :

1° à la détection d'une seule anthocyane diglucoside, le malvoside, elle substitue la séparation complète et le dosage global des anthocyanes diglucosides ;

2° à la détection visuelle tributaire de l'observateur elle substitue une mesure ;

3° grâce à l'isolement complet des diglucosides, elle permet d'éliminer des « artefacts » qui dans les méthodes utilisées jusqu'à présent, conduisaient à des résultats erronés (Ribéreau-Gayon, 1965) ;

4° elle est applicable aussi bien aux jus de raisin qu'aux vins.

Reçu pour publication en octobre 1967.

SUMMARY

ISOLATION AND DETERMINATION OF TRACES OF DIGLUCOSIDE ANTHOCYANINS IN WINES AND GRAPE JUICE

A method for isolating and determining small quantities of diglucoside anthocyanins in wines and grape juice is described. Isolation was obtained by direct two-dimensional chromatography on a thin layer of cellulose, followed by scraping off the spots and freeing them from the powder. Determinations were made spectrophotometrically. The diglucoside anthocyanin content was expressed in mg malvoside per litre and was accurate to $\pm$ 2 mg/l.

RESUMEN

EL AISLAMIENTO Y LA DOSIFICACION DE LAS CANTIDADES REDUCIDAS DE ANTOCIANOS DIGLUCOSIDAS EN LOS VINOS Y EN LOS ZUMOS DE UVA

Se propone un método de aislamiento y de dosificación de cantidades reducidas de antocianos diglucosidas, en los vinos y en los zumos de uva.

— El aislamiento se obtiene por cromatografia directa bidimensional sobre capa fina de celulosa, seguida del rasqueteado de las manchas y de su evolución a partir del polvo.

— La dosificación se lleva a cavo por espectrofotometria. El porcentaje de antocianos diglucosidas es expresado en malvosida por litro.

La precisión del método es de ± 2 mg de malvosida por litro.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DEIBNER L., BOURZEIX M., CABIBEL-HUGUES —M., 1964. Séparation des anthocyanes diglucosides par chromatographie sur couche mince et leur dosage spectrophotométrique. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 4, 359-375.

JAULMES P., NEY, 1960. Recherche des vins d'hybrides rouges par chromatographie de la matière colorante. *Ann. Falsif. Fraudes.* **149**, 155.

PATAKY M. B., 1965. Sur les particularités du dosage spectrophotométrique des anthocyanes. *Ann. Technol. agric.*, **14**., 1, 79-85.

RIBÉREAU-GAYON P., 1964. Les composés polyphénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol. vég.*, **6**, 2, 119-147 ; 3, 211-242 ; 4, 259-282.

RIBÉREAU-GAYON P., 1965. Nouvelles observations sur la différenciation des vins de *Vitis Vinifera* et d'hybrides. *C. R. Acad. Agric. de France*, 135-140.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (4), 365-372.

ÉTUDE DE L'ACTION DU GÈNE *PL 10* SUR LA RESPIRATION DE QUELQUES SUBTRATS PAR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* HANSEN

Françoise VEZINHET et P. GALZY

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Génétique,
École nationale supérieure agronomique,
Centre de Recherches agronomiques du Midi, 34 - Montpellier
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

La respiration de l'éthanol, des acides acétique, pyruvique, D-lactique et L-lactique par deux levures ne diffèrant que par un seul couple de gènes PL_{10}/pl_{10}, a été étudiée. Dans le cas de la souche mutante le système respiratoire de la cellule intacte est saturé par des concentrations plus faibles en acides acétique et pyruvique que dans le cas de la souche sauvage.

INTRODUCTION

La culture prolongée de cellules haploïdes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN sur des milieux synthétiques où la seule source de carbone est l'acide lactique ou l'éthanol entraîne la sélection de mutants « colonie lisse », facilement décelés par leur morphologie coloniale (P. GALZY 1964 *a*). L'étude des mutants sélectionnés par culture sur acide lactique a permis la mise en évidence de sept locus indépendants PL_1, PL_2, PL_3, PL_4, PL_5, PL_7, PL_8. La mutation de l'un quelconque des gènes ($PL \rightarrow pl$) entraîne le phénotype lisse (P. GALZY, 1964 *b*). L'étude des mutants sélectionnés par culture sur éthanol a montré que la mutation portait rarement sur les gènes PL_2, PL_5, PL_7, quelquefois sur le gène PL_4, mais que le plus souvent il s'agissait de la mutation de deux nouveaux gènes PL_{10} ou PL_{11} (P. GALZY, C. BIZEAU, 1965).

Ce travail va présenter quelques résultats sur le mode d'action du gène pl_{10} sur le métabolisme respiratoire de la cellule intacte.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Matériel biologique*

Les expériences ont été réalisées avec deux clones issus de la souche 4021 D_3. L'un, appelé DP_1 est de phénotype plissé, et l'autre, appelé DL_{15}, est un mutant de phénotype lisse qui ne diffère du précédent que par le gène pl_{10}.

B. — *Techniques de culture*

Toutes les cultures sont faites sur du milieu yeast extract Difco 0,5 p. 100, éthanol 1 p. 100, dans des erlenmeyers remplis au 1/10e de leur volume et agités (100 oscillations/minute, amplitude 5 cm).

C. — *Étude de la respiration*

Les mesures manométriques sont effectuées suivant la méthode directe de WARBURG. Les détails techniques ont été décrits précédemment (P. GALZY 1964-*b*).

VARIATIONS DE LA VITESSE DE RESPIRATION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT

A. — *Acide L-lactique*

Les variations de la vitesse de respiration en fonction de la concentration en acide L-lactique ont été étudiées en présence de tampon phosphate, aux deux pH 4,5 et 7. Elles ont été décrites précédemment (F. VEZINHET, P. GALZY, 1967). On ne décèle aucune différence significative entre les deux souches.

B. — *Acide D-lactique*

L'action de la concentration sur la vitesse de respiration de l'acide D-lactique est représentée sur la figure 1. Les mesures sont effectuées en présence de tampon pH 4,5.

L'établissement de toutes les courbes expérimentales est obtenu de la façon suivante : les calculs sont effectués sur les résultats des quinze premières minutes de mesure. Les vitesses nettes, c'est-à-dire corrigées de la respiration endogène, sont exprimées en pourcentage de la vitesse maximum pour chaque expérience. Les points expérimentaux représentent la moyenne de tous les pourcentages pour une concentration donnée. Le nombre d'expériences ayant servi à l'établissement des diverses courbes est indiqué pour chaque cas dans la légende.

Entre 0,38 mM et 7,8 mM la vitesse de respiration est faible pour les deux souches DP_1 et DL_{15}. Ensuite, la vitesse croît, un peu plus rapidement pour DP_1 que pour DL_{15}, mais la différence est faible. La vitesse maximum est atteinte pour les deux souches avec la concentration 380 mM. Pour des concentrations plus élevées (604 mM) il se produit une inhibition pour la souche mutante qui ne se retrouve pas

avec la souche sauvage. A l'exception de cette différence pour les fortes concentrations, la loi d'action de la concentration sur la vitesse d'oxydation de l'acide D-lactique est très voisine pour les souches sauvage et mutante.

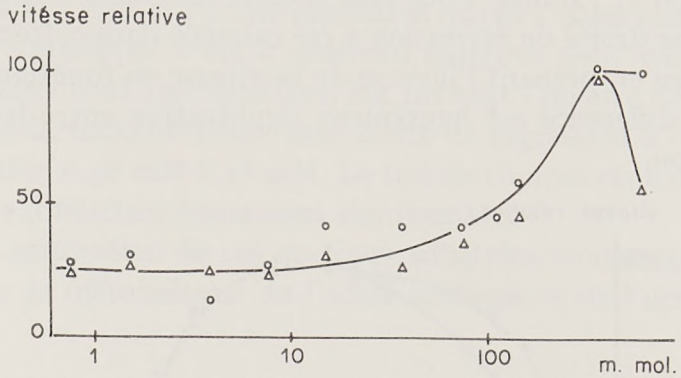


FIG. 1. — *Évolution de la vitesse de respiration de l'acide D-lactique en fonction de la concentration*
En abscisse : concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique.
En ordonnée : vitesse relative de la respiration de l'acide D-lactique exprimée en pourcentage de la vitesse maximum.
Les points expérimentaux représentent la moyenne de deux expériences indépendantes. Les déterminations sont effectuées en tampon phosphate pH = 4,5.
○ DP_1 △ DL_{15}

C. — *Éthanol*

Comme précédemment, l'évolution de la vitesse de respiration en fonction de la concentration est représentée sur la figure 2.

Les points sont assez dispersés et les courbes expérimentales complexes mais il n'y a pas de différence nette entre les deux souches.

La vitesse de respiration augmente pour les concentrations comprises entre 0,19 mM et 1,5 mM. Au-delà, elle est sensiblement constante et égale à la vitesse maximum.

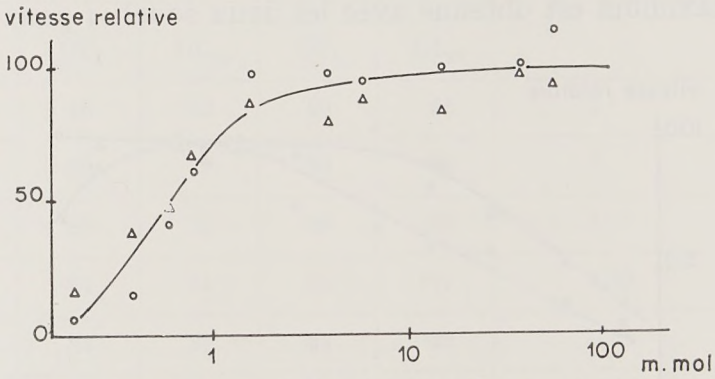


FIG. 2. — *Évolution de la vitesse de respiration de l'éthanol en fonction de la concentration*
En abscisse : concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique.
En ordonnée : vitesse relative de la respiration de l'éthanol exprimée en pourcentage de la vitesse maximum.
Les points expérimentaux représentent la moyenne de six expériences indépendantes. Les déterminations sont effectuées en tampon phosphate pH = 4,5.
○ DP_1 △ DL_{15}

D. — *Acide acétique*

La figure 3 représente la variation de la vitesse de respiration en fonction de la concentration.

La vitesse maximum est obtenue pour la concentration 7,6 mM. Pour des concentrations supérieures, il y a inhibition de l'oxydation pour les deux souches. La vitesse

devient presque nulle pour la concentration de 150 mM. A la plus faible concentration étudiée, 0,38 mM, la vitesse de respiration de la souche mutante est supérieure à celle de la souche sauvage. Elle reste supérieure pour toutes les concentrations comprises entre 0,38 mM et 7,6 mM. Pour voir si cette différence entre les deux souches est significative, une droite de régression a été calculée dans cette zone. L'ajustement linéaire a été obtenu en prenant l'inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration. La différence est hautement significative entre les pentes des deux droites de régression.

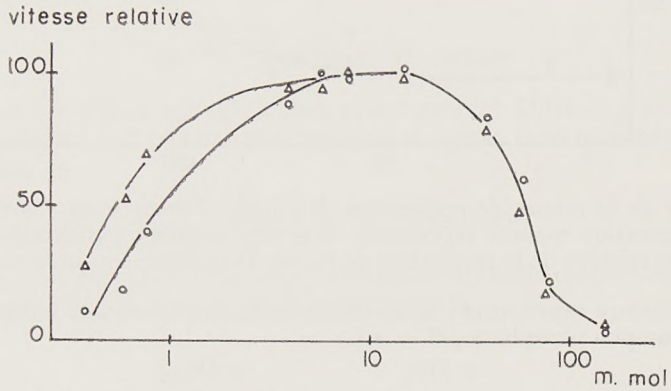


FIG. 3. — *Évolution de la vitesse de respiration de l'acide acétique en fonction de la concentration*
En abscisse : concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique.
En ordonnée : vitesse relative de la respiration de l'acide acétique exprimée en pourcentage de la vitesse maximum.
Les points expérimentaux représentent la moyenne de cinq expériences indépendantes. Les déterminations sont effectuées en tampon phosphate pH = 4,5.
○ DP_1 △ DL_{15}

E. — *Acide pyruvique*

L'action de la concentration en acide pyruvique sur les vitesses de respiration de ce substrat par DP_1 et DL_{15} est représentée sur la figure 4.

La vitesse maximum est obtenue avec les deux souches pour la concentration 150 mM.

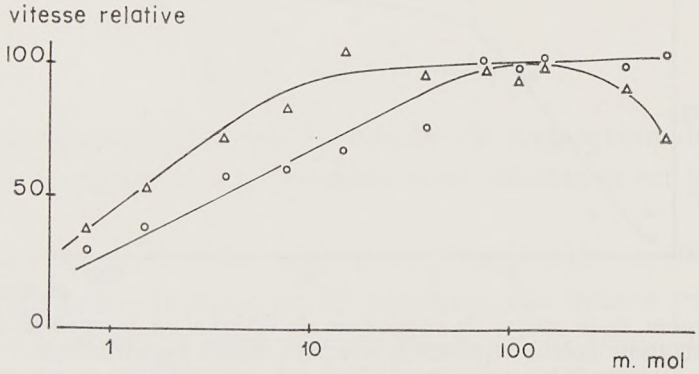


FIG. 4. — *Évolution de la vitesse de respiration de l'acide pyruvique en fonction de la concentration*
En abscisse : concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique.
En ordonnée : vitesse relative de la respiration de l'acide pyruvique, exprimée en pourcentage de la vitesse maximum.
Les points expérimentaux représentent la moyenne de cinq expériences indépendantes. Les déterminations sont effectuées en tampon phosphate pH = 4,5.
○ DP_1 △ DL_{15}

Les deux souches se comportent assez différemment l'une de l'autre. Dans le cas de la souche sauvage, la vitesse augmente pour les concentrations allant de 0,38 mM à 76 mM. Au-delà de cette concentration, la vitesse reste constante et maxi-

mum. Dans le cas de la souche mutante, les vitesses de respiration, pour les faibles concentrations, sont toujours supérieures à celles de la souche sauvage. La saturation du système respiratoire est obtenue pour la concentration 15 mM. Par contre, au-delà de la concentration 150 mM, il y a une inhibition qui ne s'observait pas chez la souche sauvage. Un test statistique a été à nouveau employé pour voir si ces différences entre les deux souches sont significatives. En prenant l'inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration, une droite de régression a été calculée pour la zone de concentration 0,38 mM à 38 mM. Le test de comparaison des pentes des deux droites indique une différence hautement significative.

L'étude de la respiration de ces quelques substrats montre que le gène pl_{10} agit essentiellement sur le métabolisme de l'acide acétique et de l'acide pyruvique.

COMPARAISON DES VITESSES MAXIMA DE RESPIRATION

Les vitesses de respiration de ces cinq substrats ont été comparées. Nous utilisons pour chaque substrat la concentration qui assure la vitesse maximum. Le tableau 1 donne, pour les deux souches, les Qo_2 (µl d'oxygène absorbés par mg de matière sèche et par heure) et les Qco_2 (µl de gaz carbonique dégagés par mg de matière sèche et par heure) déterminés pour les quinze premières minutes ainsi que les quotients respiratoires théoriques et expérimentaux.

TABLEAU 1

Qo_2, Qco_2 *et quotients respiratoires déterminés entre 0 et 15 minutes*

	Qo_2		Qco_2		Q. R. théoriques	Q. R. expérimentaux	
Substrat	DP_1	DL_{15}	DP_1	DL_{15}		DP_1	DL_{15}
Acide L-lactique	48	62	40	56	1	0,83	0,90
Acide D-lactique	90	99	70	96	1	0,78	0,97
Acide acétique	82	73	86	70	1	1,05	0,96
Acide pyruvique	74	84	85	112	1,20	1,15	1,33
Éthanol	83	87	29	29	0,66	0,35	0,33
Glucose	90	96					

A chaque expérience, une même suspension de levure sert à la détermination des Qo_2 et Qco_2 de tous les substrats. Ce mode d'expérimentation permet, par la méthode d'appariement, une interprétation statistique des différences entre substrats. Les chiffres figurant dans le tableau 1 sont les moyennes de cinq déterminations indépendantes.

Observons tout d'abord les valeurs des Qo_2 : aucune différence significative entre les deux souches n'est décelable. Nous pouvons, par contre, faire quelques constatations communes pour DP_1 et DL_{15}.

— La vitesse d'oxydation de l'acide L-lactique est nettement inférieure à celle de tous les autres substrats. Le facteur limitant doit donc être l'activité de la première enzyme de la chaîne d'oxydation, c'est-à-dire de la L-lacticodeshydrogénase, ou bien l'entrée du substrat dans la cellule.

— Tous les autres substrats, acide D-lactique, acide acétique, acide pyruvique, éthanol, glucose, ont des vitesses d'oxydation voisines et le facteur limitant doit se situer au niveau d'une étape commune de leurs métabolismes : cycle de Krebs ou respiration terminale.

L'observation des valeurs des Qco_2 ne montre pas davantage de différence entre la souche sauvage et la souche mutante.

— Le Qco_2 de l'acide L-lactique est inférieur aux valeurs obtenues pour l'acide D-lactique, l'acide acétique, l'acide pyruvique. Ceci ne fait que confirmer l'observation faite pour le Qo_2 de l'acide L-lactique.

— Les Qco_2 des acides D-lactique, acétique, pyruvique sont peu différents entre eux.

— Le Qco_2 de l'éthanol est très faible ; ceci confirme une observation déjà faite (C. Bizeau, P. Galzy 1965). L'oxydation de l'éthanol se fait avec accumulation d'acide acétique. Le NADH formé sature probablement la respiration terminale et l'oxydation de l'acide acétique est inhibée. Le fonctionnement du cycle de Krebs est dans ce cas très réduit.

La détermination du Qo_2 éthanol reflète donc essentiellement le fonctionnement de la respiration terminale : NADH cytochrome *c* réductase, cytochrome oxydase. Nous pouvons donc penser que le facteur limitant commun à l'acide D-lactique, l'acide acétique, l'acide pyruvique, l'éthanol et le glucose se situe au niveau de la respiration terminale plutôt qu'au cours d'une étape du cycle de Krebs.

Le tableau I nous permet une dernière observation, les Q. R. expérimentaux et théoriques sont voisins sauf dans le cas de l'éthanol mais l'explication en a été donnée précédemment : on mesure essentiellement l'oxydation de l'éthanol en acide acétique.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'oxydation de l'acide L-lactique est limitée par une des premières étapes de son métabolisme : entrée du substrat dans la cellule, ou plus probablement activité de la L-lacticodéshydrogénase. La loi d'action de la concentration sur la vitesse d'oxydation est simple. Dans ce cas, les deux souches sauvage et mutante ont un comportement voisin, le gène pl_{10} n'agit donc pas sur les étapes du métabolisme spécifique de l'acide L-lactique.

Pour les autres substrats : acide D-lactique, acide acétique, acide pyruvique et éthanol, le facteur limitant la vitesse d'oxydation est vraisemblablement situé au niveau de la respiration terminale. Il s'en suit une plus grande complexité des lois d'action de la concentration sur les vitesses d'oxydation de tous ces substrats. Ces lois d'action résultent d'équilibres nombreux. Ces courbes ne donnent pas de renseignements précis sur les phénomènes en cause mais permettent, malgré leur complexité de comparer la souche sauvage et la souche mutante. C'est ainsi que le calcul d'une

droite de régression dans les cas de l'acide acétique et de l'acide pyruvique n'a aucune signification biologique mais constitue uniquement une méthode de calcul permettant de comparer les deux souches.

Seules les courbes de respiration des acides acétique et pyruvique, en fonction de la concentration, montrent une différence entre les deux souches. Pour les deux substrats, le mutant DL_{15} a des vitesses de respiration supérieures à celles du sauvage, pour les concentrations inférieures à celle assurant la vitesse maximum. Le gène pl_{10} contrôle donc une étape commune des métabolismes des deux acides précédents. Ce fait est curieux à constater étant donné que la sélection du mutant DL_{15} a été obtenue après culture prolongée sur éthanol et n'a jamais pu l'être après culture sur acide acétique (P. Galzy, C. Bizeau, 1966) ou acide pyruvique (F. Vezinhet, P. Galzy, non publié).

Les observations décrites ici pourraient s'expliquer par une modification du mécanisme d'entrée dans la cellule des acides acétique et pyruvique. Il pourrait apparaître un système d'entrée actif commun à ces deux substrats. Ce fait expliquerait la différence observée entre la souche sauvage et la souche mutante sur les courbes de respiration en fonction de la concentration en acides acétique et pyruvique ; mais cette hypothèse paraît cependant très peu probable du fait qu'on n'a jamais eu de sélection de mutant après culture prolongée sur ces deux substrats.

Une autre hypothèse peut être formulée pour expliquer les faits expérimentaux, la mutation du gène PL_{10} vers pl_{10} pourrait agir au niveau du cycle de Krebs. L'acide acétique qui entre dans le cycle de Krebs, sans qu'il se produise d'oxydation, verrait dans ce cas sa vitesse d'oxydation modifiée. L'acide pyruvique est transformé en acétyl CoA par l'oxydase pyruvique avec formation de NADH et absorption d'une demi-molécule d'oxygène. Lors de l'oxydation de l'acide D-lactique en acide pyruvique, il y a réduction directe du cytochrome C par la D-lacticodéshydrogénase. C'est donc en définitive une molécule d'oxygène qui est absorbée au cours de la transformation de l'acide D-lactique en acétyl-CoA. Enfin l'oxydation de l'éthanol en acide acétique semble saturer la chaîne des cytochromes grâce au NADH formé. Il est normal dans ces conditions qu'une modification dans le fonctionnement du cycle de Krebs marque plus sur l'oxydation des acides acétique et pyruvique que sur celle des deux autres substrats. Par contre, c'est sur éthanol que cette modification peut présenter le plus grand avantage sélectif puisque, dans ce cas, le cycle de Krebs fonctionne relativement peu et constitue certainement le facteur limitant les synthèses biologiques.

En conclusion, nous pouvons penser que la mutation de PL_{10} vers pl_{10} modifie le fonctionnement d'une étape du cycle de Krebs.

Il ne s'agit là toutefois que d'une hypothèse qui devra être soumise, ultérieurement, à une vérification directe.

Reçu pour publication en septembre 1967.

SUMMARY

STUDY OF THE EFFECT OF THE GENE PL 10 ON THE RESPIRATION OF SOME SUBSTRATES BY SACCHAROMYCES CEREVISIAE HANSEN

Mutation of the gene *Pl 10* to *pl 10* does not alter the effect of substrate concentration on the rates of oxidation of L- and D-lactic acids and of ethanol, but does alter that of acetic and pyruvic acids. This suggests that gene *pl* 10 could be affecting a stage in the Krebs cycle.

RESUMEN

ESTUDIO DE LA ACCIÓN DEL GEN PL 10 SOBRE LA RESPIRACIÓN DE ALGUNOS SUBSTRATOS POR SACCHAROMYCES CEREVISIA HANSEN

La mutación del gen *Pl 10* hacia *pl 10* no modifica la leyf de la acción de la concentración en substrato sobre las velocidades de oxidación de los ácidos L-láctico, D-láctico y del etanol, pero, en cambio, modifica, aquellas de los ácidos acético y pirúvico. Todo ello ha permitido emitir la hipótesis consistente en que el gen *pl 10* podria actuar sobre el funcionamiento de una etapa del ciclo de Krebs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIZEAU C., GALZY P., 1965. Observations sur le fonctionnement de la chaîne d'oxydation de l'éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *C. R. Soc. Biol.*, **159**, 4, 944.

GALZY P., 1964 *a*. Variations génétiques de la levure au cours de la croissance sur des substrats non glucidiques. *Hereditary* **19**. 731-733.

GALZY P., 1964 *b* Étude génétique et physiologie du métabolisme de l'acide lactique chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. Thèse de Doctorat d'État. *Ann. Technol. agric.*, 13, 109-259

GALZY P., BIZEAU C., 1965. Sur le contrôle génétique de la mutation « colonie lisse » chez *Saccharomyces cerevisiae*. Étude de mutants sélectionnés par culture sur éthanol. *C. R. Acad. Sci.*, **281**, 3490-3493.

GALZY P., BIZEAU C., 1966. Étude génétique de mutants « colonie lisse » sélectionnés par culture sur acide acétique. *Ann. Technol. agric.*, **15**, 289-294.

VEZINHET F., GALZY P., 1967. Observations sur le mode d'action du gène pl_{10} chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *C. R. Acad. Sci.*, **264**, 81-84.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (4), 373-377.

NOTE DE LABORATOIRE

DÉTECTION DES DIGLUCOSIDES ANTHOCYANIQUES DANS LES VINS SUIVANT LA TECHNIQUE DE DORIER ET VERELLE

C. JOURET

Station d'Agronomie et d'Oenologie,
67, Boulevard Deltour, 31 - Toulouse
Institut national de la Recherche agronomique

SOMMAIRE

La technique de détection des diglucosides anthocyaniques des vins, présentée par DORIER et VERELLE est simple, rapide, spécifique mais dans certains échantillons de vins de *viniferas* exempts de diglucosides, l'appréciation visuelle de la présence ou de l'absence d'une fluorescence verte est délicate.

Après avoir établi les spectres de diffusion et de fluorescence de vins de *viniferas* et d'hybrides, on propose de remplacer cette observation visuelle par la mesure objective d'une intensité de fluorescence à l'aide d'un appareil.

INTRODUCTION

La technique officielle de détection par séparation des mono et diglucosides anthocyaniques par chromatographie sur papier (RIBÉREAU-GAYON P., 1953-1954-1956 ; JAULMES et NEY, 1960 ; DEIBNER et BOURZEIX, 1964) et l'observation du chromatogramme sous la lumière de Wood pour déceler la présence ou l'absence d'une fluorescence rose, est simple et sensible, mais d'interprétation délicate dans les cas douteux : taux faible de diglucosides ou vin très coloré ; en outre, cette appréciation visuelle est purement subjective et dépend de l'observateur.

DORIER et VERELLE (1966) ont proposé une technique nouvelle de détection des diglucosides anthocyaniques qui paraît intéressante à divers points de vue. Dans cette technique, l'appréciation d'une fluorescence verte se fait en milieu liquide sur le vin ayant subi une oxydation par le nitrite de sodium.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

a. *Étude de la technique*

Dans leur mémoire, les Auteurs retiennent pour les vins rouges le mode opératoire suivant :

— 1 ml de vin est placé dans un tube à essai.
— Ajouter 1 goutte d'acide chlorhydrique normal. Agiter.
— Ajouter 1 ml de nitrite de sodium à 1 p. 100. Agiter et attendre deux minutes.
— Ajouter 10 ml d'éthanol contenant 5 p. 100 d'ammoniaque. Agiter.
— Filtrer et observer en lumière de Wood.

Le filtrat soumis à l'action d'un rayonnement ultraviolet émet une vive fluorescence verte dans le cas d'un vin d'hybrides et n'est pas fluorescent quand il s'agit d'un vin de *viniferas*.

Dorier et Verelle ont montré que cette fluorescence verte provenait bien d'une transformation des diglucosides, les termes exacts de celle-ci n'étant pas encore élucidés. Les Auteurs ont, en outre, souligné la stabilité de ce dérivé fluorescent ainsi que les diverses qualités de la technique : simplicité, rapidité, sensibilité et spécificité.

Cependant, certains échantillons de vins de *viniferas* examinés dans les conditions opératoires indiquées, diffusent une lumière de nuance verte qu'il est très difficile de différencier visuellement d'une fluorescence légère due à la présence d'un faible taux de diglucosides.

Il paraît donc souhaitable pour les cas douteux de remplacer une appréciation visuelle par une évaluation objective à l'aide d'un appareil.

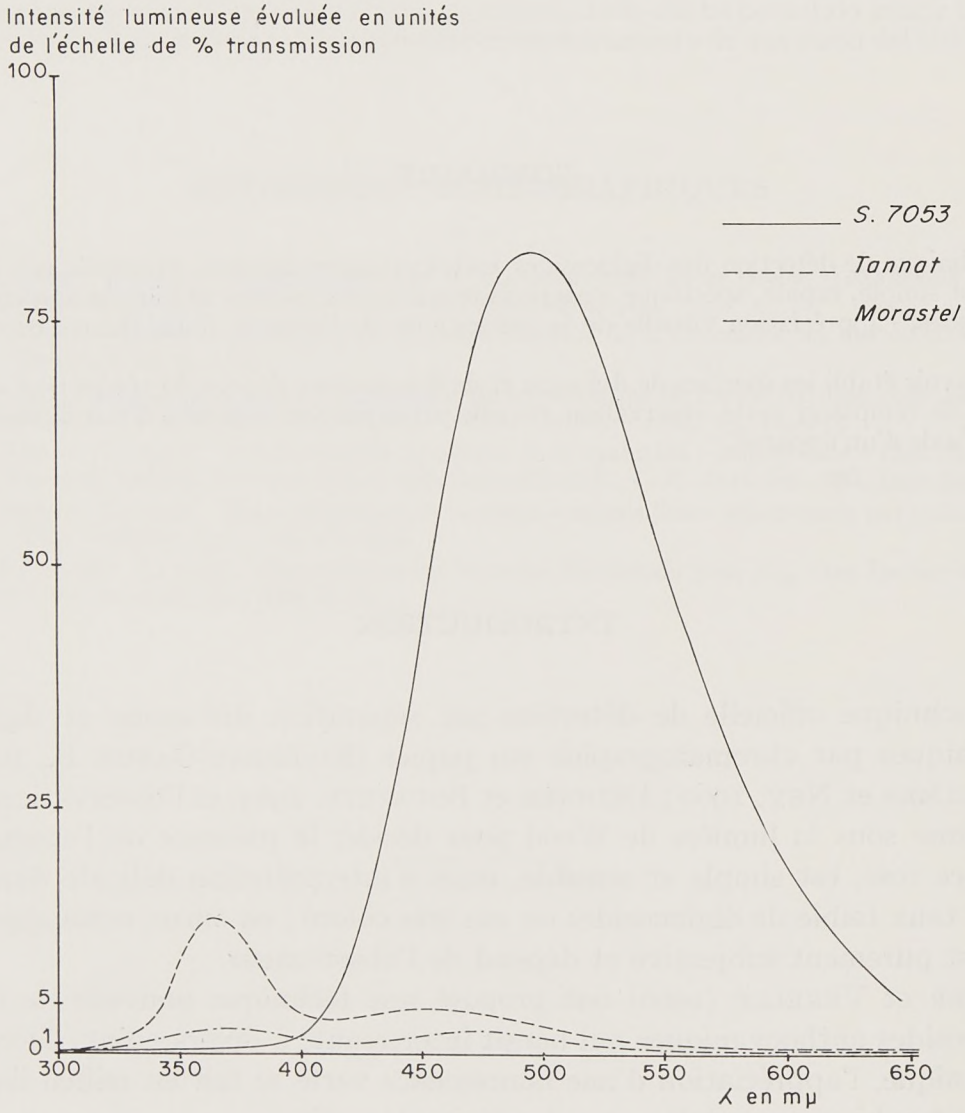


Fig. 1.

Dans ce but, les spectres de cette émission lumineuse ont été établis pour divers échantillons de vins de *viniferas* et d'hybrides purs, d'origine certaine.

Il s'agit bien entendu d'analyser le spectre de la lumière émise par l'échantillon sans tenir compte des phénomènes de diffusion. Les trois types de courbes sont rapportées ci-dessus (fig. 1) ; elles ont été établies point par point à l'aide d'un spectrophotomètre Jobin-Yvon, Maroc VI, équipé d'un dispositif de mesure de fluorescence. La lampe à vapeur de vapeur utilisée avec un filtre Wood émet les 3 raies du spectre de longueurs d'onde 365, 405 et 436 mμ.

Pour une ouverture de fente fixe, l'intensité lumineuse émise aux différentes longueurs d'onde a été appréciée en notant le chiffre de l'échelle du pourcentage de transmission du galvanomètre de l'appareil utilisé.

Ces spectres de fluorescence ont été confirmés à l'aide d'un spectrofluorimètre Jobin-Yvon « Béarn » équipé d'une lampe au xénon.

Dans le cas de vins d'hybrides, tels le *Seyve-Villard* 18 315 et le *Seibel* 7 053, on observe l'émission d'une intensité fluorescente importante avec un pic maximum à 495 mμ. L'intensité lumineuse aux longueurs d'onde inférieures à 430 mμ est négligeable comparativement.

Pour les vins de *viniferas*, l'intensité émise, ramenée aux mêmes conditions opératoires, est beaucoup plus faible : de 20 à 100 fois en prenant l'échelle conventionnelle en pourcentage de transmission. La longueur d'onde de l'émission maxima, beaucoup moins nette, varie de 450 à 485 mμ.

On note également pour les vins de *viniferas* une intensité de diffusion variable suivant les échantillons, pour les longueurs d'onde voisines de 365 mμ : l'intensité lumineuse émise à 365 mμ reste dans l'ordre de grandeur de celle émise à 450-485 mμ.

C'est la combinaison de ces deux phénomènes (maximum d'émission variant entre 450-485 mμ et diffusion plus ou moins importante à 365 mμ) qui provoque pour les vins de *viniferas* une émission lumineuse globale d'une nuance tirant plus ou moins sur le vert et rend parfois difficile l'observation directe.

b. *Modification opératoire proposée*

On a tenté de supprimer ces phénomènes gênants, par l'emploi d'un spectrofluorimètre.

Dans nos essais, les conditions d'utilisation du spectrophotomètre Jobin-Yvon, Maroc VI, avec un dispositif de fluorescence sont : lampe à vapeur de mercure avec filtre Wood pour l'émission excitatrice et appréciation de l'intensité lumineuse émise à 495 mμ avec comme filtre secondaire le prisme de l'appareil.

Pour évaluer l'intensité lumineuse due à la diffusion, on emploie pour chaque échantillon, un témoin en remplaçant la solution de nitrite de sodium par de l'eau.

Cette évaluation de la diffusion ne peut être qu'approximative car l'oxydation modifie en particulier la constitution des substances du vin. Le témoin est gris bleu ou vert alors que l'échantillon traité est d'une couleur jaune plus ou moins foncée.

On a déterminé la différence d'intensité lumineuse émise à 495 mμ par l'échantillon oxydé et le témoin sans nitrite de sodium sur des vins provenant de cépages purs d'origine géographique diverse et des récoltes de 1964, 1965 et 1966.

Pour les *viniferas* on a observé : *Carignan, Alicante Bouschet, Morastel, Tannat, Négrette, Malbec, Gamay Beaujolais, Gamay Fréau, Cabernet Sauvignon, Cinsaut, Merlot, Fer Servadou, Grenache noir et gris, Jurançon, Grand noir de la Calmette, Bordelais, Abouriou, Grolleau, Aramon,* correspondants à 62 échantillons.

Pour les hybrides : *Seyve-Villard* 18 315, *Seibel* 7 053, *Couderc* 7 120, *Seibel* 5 455, correspondants à 17 échantillons.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Pour tous les vins de *viniferas* examinés, la différence d'intensité lumineuse émise à 495 mμ entre l'échantillon ayant subi le traitement oxydatif et le témoin ne contenant pas de nitrite de sodium, a été négative ou nulle.

Les vins d'hybrides *Seyve-Villard 18 315* et *Seibel 7 053* donnent une différence positive très nette de l'ordre de 40 à 170 unités dans l'échelle conventionnelle définie ; toutes ces mesures étant ramenées aux mêmes conditions de sensibilité du spectrophotomètre.

Le *Couderc 7 120* donne une différence positive de 4 à 10 unités. Le *Seibel 5 455*, comme cela a été souligné par les Auteurs précités, ne se distingue pas des *viniferas*.

Pour ce test qualitatif, la comparaison de l'intensité de l'émission lumineuse du vin oxydé et non oxydé évite l'usage d'une courbe de fluorescence de référence. Celle-ci est difficile à établir par le choix du composé témoin.

D'autre part, l'intensité lumineuse totale émise par l'échantillon varie avec la couleur propre du vin : un échantillon de vin très coloré émet, après dilution, une intensité lumineuse plus importante du fait d'une meilleure pénétration du rayonnement d'excitation. Il est par suite impossible de relier une intensité lumineuse à un taux de diglucosides.

Par contre, la différence d'émission entre l'échantillon oxydé et non oxydé reste toujours dans le même sens quelle que soit la dilution.

On a comparé également la technique par chromatographie sur papier et celle de DORIER-VERELLE en utilisant le spectrofluorimètre. L'examen des quatre-vingts échantillons de vins d'origine diverse conduit à des conclusions identiques, conclusions très facilitées pour les cas limites par la deuxième méthode.

La quantité de diglucosides anthocyaniques des vins de raisins hybrides variant d'une façon considérable suivant les conditions écologiques de l'année, les techniques de vinification et la conservation, on n'a pas effectué la recherche d'un pourcentage minimum de diglucosides par dilution. Cependant, on peut estimer à la suite de l'essai comparatif précédent, que la sensibilité de cette méthode est de l'ordre de celle de la chromatographie sur papier.

Il reste à tester un maximum d'échantillons d'origine certaine pour essayer de chiffrer l'erreur que pourrait provoquer la présence de diglucosides détectée dans certains vins de *viniferas* (DEIBNER, BOURZEIX, 1960) ; la correction pourrait alors se faire facilement en admettant un certain degré de différence positive entre l'émission de l'échantillon et du témoin ; ce serait une solution provisoire, satisfaisante néanmoins, en attendant une méthode de dosage quantitative simple et précise des diglucosides anthocyaniques des vins.

CONCLUSION

La technique de détection des diglucosides anthocyaniques proposée par DORIER et VERELLE est simple, rapide, spécifique et d'une sensibilité comparable à la technique classique et officielle par chromatographie sur papier.

Elle offre en outre, l'avantage de pouvoir remplacer facilement une appréciation visuelle, délicate dans les cas douteux, par une mesure objective d'intensité de fluorescence à l'aide d'un appareil.

Reçu pour publication en septembre 1967.

REMERCIEMENTS

Je remercie la société Jobin et Yvon qui a fort aimablement recherché les spectres de fluorescence de certains échantillons à l'aide du spectrofluorimètre « Bearn ».

SUMMARY

DETECTION OF ANTHOCYANIC DIGLUCOSIDES IN WINES BY THE METHOD OF DORIER AND VERELLE

The presence of wines from hybrid vines can be revealed by the detection of anthocyanic diglucosides. Dorier and Verelle put forward a method for this purpose, bases on the estimation of the green fluorescence developing in a wine containing diglucosides after oxidation by sodium nitrite, but wines from certain varieties of *V. vinifera* possess a greenish luminescence which makes this estimation a delicate one. In the present work, the spectra of the diffusion and fluorescence from wines from *Vitis vinifera* and hybrid vinies are established, and an objective means of measuring the fluorescence is proposed using a spectrofluorimeter. Numerous samples of known origin are tested.

RESUMEN

DETECCION DE LOS DIGLUCOCIDAS ANTOCIANICOS EN LOS VICOS, SEGUN LA TÉCNICA DE DORIER Y VERELLE

La detección de los diglucosidas antociánicos permite poner de manifiesto la presencia de vinos procedentes de cepas híbridas.

Dorier y Verelle han presentado una técnica de detección fundada en la apreciación de una fluorescencia verde, que se desarrolla en un vino que contiene diglucosidas, previa oxidación por el nitrito do sodio.

Pero, ciertos vinos de *Vinifera* difunden una intensidad luminosa que tonalidad verde, que hace que esta apreciación resulte delicada.

Después de haber establecido los espectros de difusión y fluorescencia de los vinos de *Vinifera* y de híbrido, se propone una medida objetiva de esta fluorescencia por medio de un espectrofluorimetro.

Se han Ilevado a cabo pruebas por medio de muestras de origen certero.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1960. Sur les incertitudes dans la différenciation des cépages *vitis vinifera* et hybrides rouges par chromatographie sur papier de leurs substances colorantes. *C. R. Acad. Agric.*, **46**, 968.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1964. Recherches sur la détection des anthocyanes diglucosides dans les vins et les jus de raisin par chromatographie sur papier et fluoriscopie des taches obtenues. *Ann. Technol. agric.* **13**, 262-28.

DORIER P., VERELLE L. P., 1966. Nouvelle méthode de recherche des glucosides anthocyaniques dans les vins. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, **59**, 1-10.

JAULMES P., NEY, 1960. Recherche des vins d'hybrides rouges par chromatographie de la matière colorante. *Ann. Falsif. Expert. chim.*, **53**, 180-183.

RIBÉREAU-GAYON P., 1953. Différenciation des matières colorantes des raisins et des vins de cépages français et hybrides. *C. R. Acad. Agric.*, **39**, 800.

RIBÉREAU-GAYON P., 1954. Étude de la matière colorante des raisins rouges : application à la différenciation des cépages et des vins. *Ann. Falsif. Fraudes*, **47**, 436.

RIBÉREAU-GAYON P., 1956. Observations sur la différenciation de la matière colorante des vins rouges. *Ann. Falsif. Fraudes*, **49**, 381.

Ann. Technol. agric., 1967, **16** (4), 379-382.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1967

J. ADDA, G. GROSCLAUDE. — Conditions de pasteurisation permettant d'obtenir un lait de haute qualité 301

P. ANDRÉ, P. BÉNARD, Y. CHAMBROY, C. FLANZY, C. JOURET. — Méthode de vinification par macération carbonique.
I. — Production de jus de goutte en vinification par macération carbonique 109
II. — Production d'alcool en vinification par macération carbonique 117

C. BIZEAU. — Étude de l'inhibition de la respiration de l'acide L-lactique par l'acide oxalique chez certains mutants « colonies lisses » de *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN 125

M. BOURZEIX. — Le dosage des flavonols du vin et des extraits de raisin .. 349

M. BOURZEIX. — L'isolement et le dosage des faibles quantités d'anthocyanes diglucosides dans les vins et les jus de raisin 357

H. BOUSCHARAIN, J. BERGERET. — Difficultés d'interprétation de l'indice des substances aromatiques volatiles du jus de cassis. Variations de cet indice, de la teneur en méthanol, de l'acidité et des glucides solubles, au cours de la fabrication 269

G. DAUFIN, M. SAINCLIVIER. — Utilisation des ultra-sons pour récupérer les germes contenus dans un film de lait adhérant aux surfaces métalliques 195

M. DEMEAUX, P. BIDAN. — Étude de l'inactivation par la chaleur de la polyphénoloxydase du jus de raisin 75

C. FLANZY, P. ANDRÉ, M. FLANZY, Y. CHAMBROY. — Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique.
I. — Influence de la température 27
II. — Influence de la durée d'anaérobiose 89

M. FLANZY, S. AUBERT. — Observations sur la défécation des vins de *Vitis vinifera* et d'hybrides. Essai de différenciation des vins d'hybrides blancs. 241

B. GODON, L. PETIT. — Action des ultra-sons sur les propriétés physico-chimiques du gluten. I. — Matériel et méthodes 205

T. IVANOV. — Sur l'oxydation du moût de raisin.
I. — Activité de la polyphénoloxydase du raisin des cépages *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* et *Aligoté* 35
II. — Étude comparée de l'anhydride sulfureux et de la bentonite en tant qu'inactivateurs de la polyphénoloxydase du moût de raisin 81

V. LEPADATU, Ioana TANASE. — Recherches sur l'évolution de la teneur en glucides et en acides aminés dans la première phase de la vinification en rouge 321

J.-L. MAUBOIS, G. MOCQUOT, E. BLANC-PATIN. — Influence de la concentration du lait sur la quantité de substance sèche de « fromage » obtenue après coagulation par la présure 287

B. MONTIES. — Potentiel d'oxydo-réduction des polyphénols. Caractérisation potentiométrique des constituants phénoliques du jus de pomme et des boissons 251

J. MOURGUES, P. BÉNARD, C. FLANZY, C. JOURET. — Techniques de vinification en rouge et potentiel oxydoréducteur 333

J.-L. MULTON, A. GUILBOT. — Méthode de détermination rapide des isothermes de sorption de vapeur d'eau 5

Andrée OURNAC, M. FLANZY. — Enrichissement en vitamine B_1 des vins conservés au contact de lies 41

Andrée OURNAC, Marcelle DÉCOR. — Riboflavine dans le raisin au cours de sa croissance 309

A. PUISSANT, Huguette LÉON. — La matière colorante des grains de raisins de certains cépages cultivés en Anjou en 1965 217

J.-P. ROSON. — Recherches sur la vinification des vins rosés 227

M. SOUTY, Annick PERRET, P. ANDRÉ. — Premières observations sur quelques variétés de Pêches destinées à la conserve 55

Françoise VEZINHET, P. GALZY. — Étude de l'action du gène *Pl 10* sur la respiration de quelques substrats par *Sacchromyces cerevisiae* HANSEN .. 365

Mise au point bibliographique.

P. FEILLET. — Les protéines solubles des céréales 135

Note de laboratoire.

C. JOURET. — Détection des diglucosides anthocyaniques dans les vins suivant la technique de Dorier et Verelle 373

Chronique des livres 69

CONTENTS

J. ADDA, G. GROSCLAUDE. — Pasteurization standards for high quality pasteurized milk 301

P. ANDRÉ, P. BÉNARD, Y. CHAMBROY, C. FLANZY, C. JOURET. — On the method of wine-making by carbonic maceration.

I. — Production of grape juice in wine-making by carbonic maceration 109

II. — Production of alcohol in wine-making by carbonic maceration .. 117

C. Bizeau. — Study of the inhibition of L-lactic acid respiration by oxalic acid in certain « smooth colony » mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 125

M. Bourzeix. — Determination of flavonols in wine and grape extracts.... 349

M. Bourzeix. — Isolation and determination of traces of diglucoside anthocyanins in wines and grape juice 357

H. Bouscharain, J. Bergeret. — Difficulties in interpreting the index of volatile aromatic substances from blackcurrant juice. Variations in this index, in methanol content, in acidity, and in the soluble glucosides during manufacture 269

G. Daufin, M. Sainclivier. — The use of ultra-sounds for the removal of germs contained in a milk film fixed on metal surfaces 195

M. Demeaux, P. Bidan. — Study of the inactivation of grape juice polyphenoloxidase by heat 75

C. Flanzy, P. André, M. Flanzy, Y. Chambroy. — Quantitative variations in non-ketonic, non volatile stable organic acids in grape berries under carbonic anaerobiosis.

I. — The effect of temperature 27

II. — The effect of the duration of anaerobiosis 89

M. Flanzy, S. Aubert. — Observations on the clarification of wines from *Vitis vinifera* and from hybrids. An attempt to differentiate the wines of white hybrids 241

B. Godon, L. Petit. — Ultrasonics effects on the physico-chemical properties of gluten 205

T. Ivanov. — Oxidation of grape must.

I. — The polyphenoloxidase activity of grapes of the *Muscat rouge, Dimiat, Riesling* and *Aligoté* varieties 35

II. — A comparative study of sulphur dioxide and of bentonite RN as inactivators of grape must polyphenoloxidase 81

V. Lepadatu, Ioana Tanase. — Changes in the carbohydrate and amino acid contents during the primary stage of making red wine 321

J.-L. Maubois, G. Mocquot, E. Blanc-Patin. — Influence of milk concentration on the yield of cheese solids not fat after clotting with rennet.. 287

B. Monties. — Oxydo-reduction potential of polyphenols. Potentiometrical determination of the phenolic components of apple juice and beverages.. 251

J. Mourgues, P. Bénard, C. Flanzy, C. Jouret. — Techniques of red wine making and redox potential 333

J.-L. Multon, A. Guilbot. — Method for quick determination of water vapor sorption isotherms 5

Andrée Ournac, M. Flanzy. — The increase in vitamin B_1 in wine stored with its lees 41

Andrée Ournac, Marcelle Décor. — Changes in the riboflavin content of grapes during development 309

A. PUISSANT, Huguette LÉON. — The colouring matter of grapes of certain vines cultivated in Anjou in 1965 217

J.-P. ROSON. — Research on the vinification of *Rosé* wines 227

M. SOUTY, Annick PERRET, P. ANDRÉ. — Observations on some varieties of peaches used for canning 55

Françoise VEZINHET, P. GALZY. — Study of the effect *Pl 10* on the respiration of some substrates by *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN 365

Review.

P. FEILLET. — The soluble proteins of cereals 135

Laboratory note.

C. JOURET. — Detection of anthocyanic diglucosides in wines by the method of Dorier and Verelle 373

Book review 69

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire* : il ne devra pas comporter d'abréviation ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire :* résumé suffisament précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse épéter les expériences ; d) *résultats* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds les dons... ; h) *Références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet* placé en tête de l'article. Les figures graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : DUPONT et DUVAL 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de et *al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatres langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon le World List of Scientific Periodicals, où le Bulletin Signalétique du C.N.R.S. ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.

Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est : 16 × 24 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12,4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront deux épreuves à corriger. Les corrections « d'auteur » ne sont autorisées que sur le premier jeu d'épreuves.

Envoi du manuscrit : M. FLANZY, Station centrale de Technologie des produits végétaux, 11-Narbonne France, ou M. MOCQUOT, Station centrale de Technologie des produits animaux, 78-Jouy-en Josas. Envoyer deux exemplaires.

TECHNOLOGIE AGRICOLE.

Le Directeur-Gérant de la publication : M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 4-1968.

Dépôt légal : 2e trimestre 1968. N° d'impression : 1770.